

UNIVERSITÉ DE LIÈGE — INSTITUT DE MÉDECINE

DÉPARTEMENT DE CLINIQUE ET DE PATHOLOGIE MÉDICALES

FIBRINOLYSE
ET
PATHOLOGIE VASCULAIRE

PAR

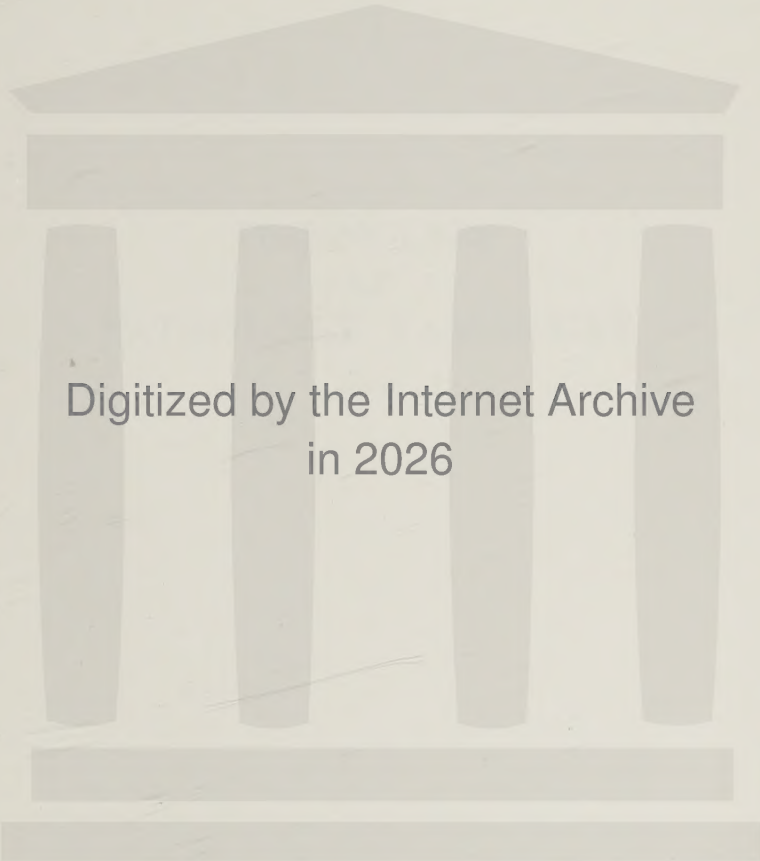
J. SALMON

Docteur en Médecine
Chef de Travaux

THÈSE D'AGRÉGATION
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
PRÉSENTÉE A LA
FACULTÉ DE MÉDECINE
DE L'UNIVERSITÉ DE LIÈGE

LANE LIBRARY. STANFORD UNIVERSITY

ÉDITIONS ARSCIA S.A.
BRUXELLES
1964



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**FIBRINOLYSE
ET
PATHOLOGIE VASCULAIRE**

UNIVERSITÉ DE LIÈGE — INSTITUT DE MÉDECINE

DÉPARTEMENT DE CLINIQUE ET DE PATHOLOGIE MÉDICALES

FIBRINOLYSE
ET
PATHOLOGIE VASCULAIRE

PAR

J. SALMON

Docteur en Médecine

Chef de Travaux

THÈSE D'AGRÉGATION
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
PRÉSENTÉE A LA
FACULTÉ DE MÉDECINE
DE L'UNIVERSITÉ DE LIÈGE

ÉDITIONS ARSCIA S.A.
60, RUE DE L'ÉTUVE — BRUXELLES
1964

*Tous droits de traduction,
d'adaptation et de reproduction
par tous procédés, y compris la
photographie et les microfilms,
réservés pour tous pays.*

© 1964 by ÉDITIONS ARSCIA S. A.

(Printed in Belgium)

UNIVERSITÉ DE LIÈGE

FACULTÉ DE MÉDECINE

Le présent mémoire peut être livré à l'impression

Liège, le 14 avril 1964.

Le Secrétaire de la Faculté,
(s) R. EISENRING

Le Président du Jury
Pro-Doyen de la Faculté de Médecine,
(s) W. ESSER

Le Secrétaire du Jury,
(s) A. NIZET

Article 6 de l'arrêté royal du 10 mars 1931 appliquant la loi du 21 mai 1929 sur la collation des grades académiques et le programme des examens universitaires :

« En aucun cas, les opinions de l'auteur ne peuvent être considérées, par le fait de l'autorisation d'impression de la dissertation, comme étant celles du Jury ou de l'Université. »

IL nous est particulièrement agréable de pouvoir exprimer ici notre plus profonde gratitude envers les Maîtres dont l'enseignement nous a permis la réalisation de ce travail.

Dès nos plus jeunes années, le Professeur M. Welsch nous a suscité le goût des sciences naturelles. Nous accueillant ensuite pendant une longue période en son laboratoire de microbiologie, il nous forma à la discipline scientifique. Qu'il trouve ici le témoignage de notre plus profonde gratitude.

C'est au Professeur Roskam que nous devons notre formation médicale. Nous l'en remercions très vivement. Il nous confia ensuite un sujet de recherche qui lui est particulièrement cher : « La pathogénie du purpura thrombopénique ». Nous espérons ne pas avoir trahi sa confiance et tenons à lui exprimer notre vive reconnaissance pour la constante sollicitude qu'il n'a cessé de nous accorder.

Sans le dynamisme de notre jeune patron, le Professeur Van Cauwenberge, nous n'aurions pu mener à bien la rédaction de ce mémoire. Jamais, il ne cessa de se passionner pour nos résultats expérimentaux ou thérapeutiques, tout en nous procurant les facilités nécessaires à la poursuite de nos travaux. Trop souvent, il sacrifia son repos et sa quiétude pour nous fournir le stimulus et les conseils nécessaires à la réalisation de cette thèse. Qu'il sache combien nous apprécions son aide et combien grande est notre dette à son égard.

Nous remercions le Professeur Martin qui, à Genève, nous accueillit dans ses laboratoires de la Polyclinique médicale universitaire. Pendant ce stage, nous eûmes l'agréable privilège de travailler sous la direction du docteur Scheidegger, dont nous nous honorons de l'amitié.

Le Professeur Miescher, de Bâle, nous enseigna les bases de l'immunopathologie. Nous lui en sommes infiniment reconnaissant.

Au cours de nos recherches, nous eûmes une collaboration fructueuse avec le Professeur Lecomte. Nous le remercions de la sympathie qu'il n'a cessé de nous témoigner.

Le concours des Services des Professeurs Betz, Heusghem, Leroux et Moureau nous fut souvent nécessaire : jamais il ne fut ménagé.

Nous avons trouvé auprès des Professeurs Honoré, Nizet et Orban l'accueil le plus cordial : nombre de leurs patients nous ont été confiés. Nous en sommes très flattés.

La participation du Professeur Hugues à certains de nos travaux nous fut des plus précieuses. Nous sommes heureux de pouvoir l'en remercier.

Les docteurs Delvigne et Lambert nous ont remarquablement aidé lors de nos investigations cliniques. Qu'ils soient assurés de notre vive reconnaissance.

Nous tenons à exprimer notre gratitude aux divers organismes qui ont subsidié nos recherches et permis nos nombreux voyages à l'étranger : le Fonds National de la Recherche Scientifique, le Fonds de la Recherche Scientifique Médicale et la Commission Administrative du Patrimoine de notre Université.

La publication de ce mémoire est due au généreux mécénat de M. A. Christiaens. Nous lui en sommes profondément reconnaissant. Nous tenons également à remercier le docteur C. Pirson et M. V. Guelton pour l'aide précieuse qu'ils nous ont apportée dans la réalisation de cette édition.

C'est à Mlle J. Lambert qu'échut la tâche ingrate de taper notre manuscrit. Qu'elle soit assurée de notre sympathie.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION GÉNÉRALE	19
---------------------------------	----

PREMIÈRE PARTIE

SYSTÈME FIBRINOLYTIQUE	25
----------------------------------	----

Chapitre I. Description du système fibrinolytique	27
--	-----------

1. Le plasminogène ou profibrinolyse	27
2. Les activateurs du système fibrinolytique	29
a) Activateur tissulaire	29
b) Activateur sanguin	30
c) Urokinase	30
d) Trypsine	31
e) Autres activateurs	31
3. La plasmine ou fibrinolyse	32
4. Inhibiteurs du système fibrinolytique	32
a) Les inhibiteurs de l'activation	34
b) Les anti-plasmines	34

Chapitre II. Mesure de l'activité du système fibrinolytique	37
--	-----------

A. Techniques utilisées	37
--	-----------

1. Lyse du caillot de sang total	37
2. Lyse du caillot de plasma	37
3. Lyse du caillot d'euglobulines	38
4. Plaques de fibrine	38
5. Dissolution du caillot marqué à l'iode radioactif	39
6. Lyse du caillot marqué à l'aide d'un indicateur fluorescent	40
7. Test à la caséine	40
8. Substrats synthétiques	41

	<i>Pages</i>
9. La thrombo-élastographie	41
10. Dosage du fibrinogène	41
B. Expérience personnelle	42
CONCLUSIONS DE LA PREMIÈRE PARTIE	44

DEUXIÈME PARTIE

PATHOGÉNIE DU PURPURA THROMBOPÉNIQUE. RÔLE ÉVENTUEL DES ENZYMES FIBRINOLYTIQUES DANS LA PATHOGÉNIE DE CETTE AFFECTION	45
INTRODUCTION	47
Chapitre I. Recherche d'antigènes communs aux plaquettes et aux parois vasculaires	49
A. Étude des antigènes plaquettaires	49
1. Matériel	49
2. Techniques immunologiques	52
3. Résultats : I. Étude des plaquettes humaines	54
1) Plaquettes et protéines plasmatiques	54
2) Situation des protéines plasmatiques au niveau des plaquettes	57
3) Fixation des protéines plasmatiques aux plaquettes	58
4) Antigènes spécifiquement plaquettaires	61
II. Étude des plaquettes de diverses espèces animales	61
III. Application des recherches antérieures à l'analyse des plaquettes du rat	62
1. Matériel	62
2. Résultats	63
B. Recherche d'une parenté antigénique entre plaquettes et parois vasculaires	65
1. Matériel et méthodes	65
2. Résultats	66
a) Analyse immunoélectrophorétique et précipitation en gélose	66
b) Agglutination	67
c) Immunofluorescence	69
3. Discussion	69
4. Conclusions	71

Chapitre II. Action des sérums anti-plaquettes, anti-fibrinogène et anti- vaisseaux chez le rat	73
A. Sérum anti-plaquettes	73
1. Matériel et méthodes	73
2. Résultats	74
a) Effet du sérum anti-plaquettes administré par voie intra-veineuse	74
b) Action du sérum anti-plaquettes injecté par voie sous-cutanée . .	77
B. Sérum anti-fibrinogène	82
C. Sérum anti-vaisseaux	85
Discussion	88
Conclusions	89
Chapitre III. Cinétique du purpura thrombopénique immunologique. — Rôle éventuel des enzymes protéolytiques dans la genèse des altérations vasculaires	91
1. Matériel et méthodes	91
2. Résultats	92
3. Discussion	93
4. Conclusions	95
Chapitre IV. Rôle de la fibrinolyse dans la genèse des pétéchies apparaissant lors du purpura thrombopénique immunologique	97
A. Activation du système fibrinolytique	97
1. Matériel et méthodes	97
2. Résultats	98
B. Inhibition de l'activité du système fibrinolytique	98
1. Matériel et méthodes	100
2. Résultats	100
3. Discussion	102
4. Conclusions	103
Chapitre V. Rôles respectifs de la thrombopénie et du phénomène immunologique dans la production des altérations vasculaires : Purpura dissocié	105
1. Matériel et méthodes	106

	<i>Pages</i>
2. Résultats	107
3. Discussion	108
4. Conclusions	110
Chapitre VI. Rôle du complément dans le phénomène immunologique	111
1. Matériel et méthodes	112
2. Résultats	113
3. Discussion	116
4. Conclusions	117
Chapitre VII. Recherche du lieu d'action des enzymes fibrinolytiques responsables de la lésion vasculaire	119
1. Matériel et méthodes	119
2. Résultats	121
3. Discussion	123
4. Conclusions	124
Chapitre VIII. Thrombopénie et fibrinolyse en pathologie humaine	125
1. Matériel et méthodes	125
2. Résultats	126
a) Maladie de Werlhof	126
b) Thrombopénie par aplasie médullaire	129
c) Anémie	130
d) Leucémie	130
e) Fibrinolyse thérapeutique	131
3. Discussion	132
4. Conclusions	134
CONCLUSIONS DE LA 2^e PARTIE	135

TROISIÈME PARTIE

APPLICATION DES TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES A L'ÉTUDE DU SYSTÈME FIBRINOLYTIQUE	139
INTRODUCTION	141
1. Fibrinolyse et coagulation continues	141

	<i>Pages</i>
2. Activation du système fibrinolytique	142
3. Système fibrinolytique tissulaire	143
4. Pathogénie des accidents fibrinolytiques	143
Chapitre I. Étude immunochimique du fibrinogène et de ses dérivés	149
1. Matériel et méthodes	150
2. Résultats	152
a) Étude du fibrinogène	152
b) Étude comparée du fibrinogène et de la fibrine	154
c) Étude immunochimique de la dégradation du fibrinogène et de la fibrine	154
3. Discussion	159
a) Structures antigéniques du fibrinogène et des produits de fibrinolyse et de fibrinogénolyse	159
b) Structures immunochimiques de la fibrine	161
4. Conclusions	161
Chapitre II. Applications de l'étude immunologique du fibrinogène et de ses dérivés	163
a) Mise en évidence de produits de dégradation du fibrinogène ou de la fibrine dans le sang humain normal	163
b) Application de l'immunochimie à l'étude de la fibrinolyse en pathologie humaine	165
Conclusions	169
CONCLUSIONS DE LA 3^e PARTIE	171

QUATRIÈME PARTIE

PLACE DE LA FIBRINOLYSE DANS LA THÉRAPEUTIQUE DES AFFECTIIONS VASCULAIRES	173
1. Agents fibrinolytiques	175
2. Indications du traitement fibrinolytique	178

	<i>Pages</i>
3. Réalisation pratique du traitement fibrinolytique	179
4. Complications du traitement fibrinolytique	182
5. Résultats personnels	183
6. Discussion	199
7. Conclusions	200
 CONCLUSIONS GÉNÉRALES	 203
 BIBLIOGRAPHIE	 209

« La discipline scientifique l'avait habitué à penser que, dans le monde social comme dans celui de la vie organique, tout est problème et problème difficile ; que dans tous les domaines, la recherche de la vérité exige l'application, l'étude, la compétence. »

R. MARTIN DU GARD.

INTRODUCTION

L'hémostase est considérée comme l'ensemble des mécanismes qui limitent les pertes de sang en cas d'effraction vasculaire. Elle dépend de trois facteurs intervenant en parfaite harmonie : le système de coagulation, les plaquettes, la paroi des vaisseaux.

Le rôle joué par les plaquettes dans l'hémostase est connu grâce aux nombreux travaux réalisés tant *in vivo* qu'*in vitro*. Elles sont les éléments constructifs du clou hémostatique, dont l'élaboration constitue le premier stade de l'arrêt des saignements (ROSKAM, 1951). Intervient ensuite le système de coagulation qui consolide secondairement le bouchon plaquettaire primitivement formé.

L'importance du facteur vasculaire est, par contre, encore mal définie. Si sa participation dans certaines hémorragies, dites spontanées, est démontrée depuis de nombreuses années par les travaux de diverses écoles (BEDSON, 1922 ; ROSKAM, 1923, 1934 ; JAKES, 1961), nous ne connaissons cependant ni la façon selon laquelle ce facteur intervient dans la genèse des hémorragies, ni la nature des agents susceptibles d'altérer l'intégrité des vaisseaux. On sait, néanmoins, qu'il ne paraît pas être lié au système de la coagulation : de nombreux sujets atteints d'un déficit grave en l'un des constituants de ce système ne présentent que très rarement des saignements spontanés.

L'intégrité vasculaire semble par contre être liée au taux des plaquettes présentes dans le sang circulant, car une importante réduction de la thrombocytose est souvent suivie d'un purpura généralisé. Mais s'il existe un certain lien entre la réduction du taux des plaquettes et la tendance aux saignements, celui-ci est loin d'être constant. Cette absence de corrélation absolue ne corrobore donc pas l'opinion de TOCANTINS et STEWART (1939) selon laquelle les plaquettes seraient utilisées pour réparer les multiples lésions vasculaires survenant, selon ces auteurs, de façon continue chez l'individu normal. On sait d'ailleurs que, dans les thrombopénies, le traitement par corticoïdes et la splénectomie diminuent la tendance aux saignements spontanés et la fragilité vasculaire avant que ne s'accroisse le taux des plaquettes.

Ainsi que ROSKAM (1934), puis d'autres l'ont démontré, la thrombopénie ne peut, à elle seule, engendrer du purpura. D'autre part, comme le signale KRAMAR (1961), une faible résistance capillaire, parfois ren-

contrée chez des sujets apparemment sains, ne peut expliquer non plus, à elle seule, la tendance aux hémorragies. Après ROSKAM (1934), cet auteur conclut que la propension aux saignements dépend de l'association de deux facteurs : résistance capillaire basse et déficience plaquettaire. Toutefois, la nature de la relation existant entre plaquettes et vaisseaux est toujours obscure. C'est à son étude que sera consacrée la partie principale de notre travail.

Si, jusqu'il y a peu, on considérait généralement que le système hémostatique se trouve à l'état de repos chez l'individu normal, prêt à fonctionner en cas de rupture vasculaire, divers auteurs estiment, au contraire, qu'il serait continuellement en activité de façon à préserver l'intégrité des vaisseaux. Cette théorie implique, bien entendu, l'existence d'un mécanisme inverse détruisant aussitôt les produits formés par le premier système et réalisant ainsi un équilibre biologique dont la rupture serait désastreuse. Cette théorie (ASTRUP, 1958), déjà suggérée par NOLF (1908) qui assignait à la coagulation un rôle de nutrition, a suscité un intérêt croissant durant ces dernières années grâce à une connaissance plus approfondie de la fibrinolyse.

Selon certains, la résistance vasculaire dépendrait de la présence de fibrine sur l'endothélium (LEVENE, 1956 ; ROSS, 1957) ; cependant, ces observations restent encore très controversées. Utilisant le microscope électronique, LEVENE (1956) et ROSS (1957) ont mis en évidence des fibres de fibrine sur les parois des vaisseaux. Toutefois il n'est pas possible de préciser si les fibres observées étaient déjà présentes avant la mort de l'animal d'expérience. D'autre part, à l'aide des techniques d'immunofluorescence, on n'a pu démontrer la présence de fibrine ni sur l'endothélium vasculaire, ni dans les tissus normaux (GITLIN, 1959). Nous confirmerons d'ailleurs ces constatations dans le présent travail.

Ces résultats négatifs ne permettent cependant pas d'infirmier la théorie de la « balance hémostatique » d'ASTRUP (1958) selon laquelle il existerait dans l'organisme un équilibre dynamique entre la formation de fibrine et sa dissolution par la plasmine. Très séduisante, elle a suscité de nombreuses discussions, mais il n'est actuellement pas encore possible de décider si elle doit être acceptée ou rejetée (HJÖRT et HASSELBACH, 1961). Nous serons amené à envisager cette théorie au cours de notre étude et nous apporterons de nouveaux éléments à son propos.

Cherchant à déceler la présence et à préciser le rôle du fibrinogène et de la fibrine au niveau de la paroi vasculaire, intéressé par conséquent au problème de la fibrinolyse continue, nous en avons abordé l'étude

à l'aide des techniques immunochimiques, telles la précipitation en gélose et l'immunoélectrophorèse, dont le développement récent a permis de montrer qu'aux altérations chimiques de certaines molécules correspondent des modifications de leur structure antigénique. Ces recherches nous ont naturellement mené à l'étude comparée du fibrinogène, de la fibrine et de leurs dérivés, produits de fibrinogénolyse et de fibrinolyse.

Le développement rapide et récent de nos connaissances dans le domaine de la fibrinolyse s'explique par l'intérêt que pourrait jouer le système fibrinolytique dans la thérapeutique des affections thrombo-emboliques. Si le phénomène de fibrinolyse est connu depuis la fin du siècle passé (DASTRE, 1893), son étude approfondie n'a cependant été entreprise que depuis une quinzaine d'années, sous la stimulation des applications thérapeutiques possibles. Malgré les nombreux essais effectués, particulièrement aux Etats-Unis, le traitement fibrinolytique des affections thrombo-emboliques en est toujours au stade expérimental. Son efficacité fait encore l'objet de nombreuses controverses. Intéressé au problème de la fibrinolyse, nous avons particulièrement envisagé son aspect thérapeutique dans les affections thrombo-emboliques artérielles. L'exposé de notre expérience clinique constitue la dernière partie de ce mémoire.

Nos recherches, initialement destinées à mieux préciser l'importance du facteur vasculaire responsable des suffusions hémorragiques dans les thrombopénies, nous ont ainsi permis d'envisager le rôle que peut jouer la fibrinolyse en pathologie vasculaire, dans ses aspects pathogéniques et thérapeutiques.

PREMIÈRE PARTIE

SYSTÈME FIBRINOLYTIQUE

CHAPITRE I

DESCRIPTION DU SYSTÈME FIBRINOLYTIQUE

LES progrès remarquables réalisés ces dernières années dans notre connaissance du système fibrinolytique s'expliquent par l'intérêt que soulèvent les médications thrombolytiques dans le traitement des affections thrombo-emboliques et par le rôle que pourraient jouer les perturbations de ce système dans la pathogénie de l'athérosclérose (ASTRUP, 1959 ; DUGUID, 1959).

Le sang humain renferme deux systèmes enzymatiques qui se ressemblent étrangement, mais dont les conséquences ultimes sont totalement opposées (Tableau I) : la **coagulation** donne naissance à la fibrine, tandis que la **fibrinolyse** détruit cette dernière (KOLLER, 1960).

Les deux systèmes comprennent un proenzyme inactif : la prothrombine dans la coagulation, la profibrinolysine ou plasminogène dans la fibrinolyse. Ce précurseur peut être transformé en enzyme actif sous l'action soit d'un activateur tissulaire, soit d'un activateur sanguin. Les deux enzymes sont des protéases : la thrombine scinde le fibrinogène en deux peptides au moins, les fibrinopeptides, et en fibrine sous forme monomérique. Celle-ci se polymérise ensuite en caillot de fibrine. La fibrinolysine dégrade cette dernière en polypeptides, produits de la fibrinolyse.

Voyons en détail les propriétés de chaque agent du système fibrinolytique.

1. Le plasminogène ou profibrinolysine.

Cette protéine plasmatique possède les caractéristiques d'une globuline (SHULMAN *et al.*, 1958). Synthétisée par le foie, son taux est abaissé en cas de grande insuffisance hépatique. Ayant un poids moléculaire d'environ 150.000, elle migre en électrophorèse, au pH 8,6,

TABEAU I



Coagulation et Fibrinolyse
(d'après KOLLER, 1960)

comme une β -globuline rapide. Elle a pu être isolée, purifiée et cristallisée depuis environ 10 ans (KLINE, 1953).

De nombreuses études ont pu être réalisées quant à sa constitution chimique, ses propriétés physico-chimiques, le mécanisme de son activation en plasmine. Cette dernière transformation s'accompagne de la libération de peptides, aboutissant à la formation d'une protéine plus petite, qui est l'enzyme actif.

Les propriétés physico-chimiques du plasminogène sont telles qu'il contamine pratiquement toutes les préparations de fibrinogène et de fibrine. Toutefois, il est inactivé par chauffage à une température supérieure à 70°, et son intervention dans un caillot de fibrine peut être supprimée en portant ce dernier à 80°C pendant 30 minutes (LASSEN, 1952).

Dans le sang circulant, l'induction d'une activité fibrinolytique dépend de la transformation du plasminogène en plasmine qui a probablement lieu à l'état physiologique et certainement dans une série de conditions pathologiques. Le mécanisme intime de la réaction nous est encore mal connu. Ce que nous savons du processus de l'activation est essentiellement dû à des études faites *in vitro*. La profibrinolysine peut se trouver activée en présence de glycérol ou sous l'action du chloroforme (ALKJAERSIG, FLETCHER et SHERRY, 1958). Elle peut être transformée sous l'effet de la trypsine, vraisemblablement par destruction de liaisons peptidiques. *In vivo*, elle peut être activée par un activateur tissulaire, un activateur sanguin ou un activateur urinaire, ou encore sous l'action d'agents exogènes introduits dans l'organisme, telle la streptokinase, dont l'intérêt ressortira dans les applications thérapeutiques de la fibrinolyse.

Le principe du dosage du plasminogène est simple : il est basé sur la transformation du proenzyme en enzyme actif sous l'action de la streptokinase. La fibrinolysine formée est ensuite dosée soit sur fibrine chauffée, soit sur caséine, soit sur un substrat synthétique, tel le TAME (Tosyl Arginine Methyl ester).

2. Les activateurs du système fibrinolytique.

a) **Activateur tissulaire.** — Cet agent, présent dans divers tissus de l'homme et de l'animal, semble lié à certaines structures cellulaires (TAGNON et PALADE, 1950). Depuis qu'on sait l'extraire à l'aide de thiocyanate de potassium, on a pu démontrer combien sa teneur varie

selon l'organe envisagé (ALBRECHTSEN, 1959). Il est abondant dans l'utérus, les surrénales, la prostate, la thyroïde, les poumons. Il est absent du foie normal, mais on le rencontre dans le tissu conjonctif qui envahit le parenchyme hépatique en cas de cirrhose (ASTRUP *et al.*, 1960).

Sa localisation permet d'expliquer nombre des accidents fibrinolytiques rencontrés en pathologie chirurgicale. Il jouerait un rôle important dans les phénomènes inflammatoires en permettant la résorption des dépôts fibrineux, étape préalable à la croissance tissulaire.

Dans les parois vasculaires, on le retrouve au niveau de l'adventice, où son rôle demeure toujours mystérieux (ASTRUP, 1959).

b) **Activateur sanguin.** — La nature de l'activateur sanguin est toujours inconnue. Il accompagne le précipité des euglobulines plasmatiques. A l'aide de techniques sensibles, il est possible d'en déceler de faibles quantités dans le sang humain normal (SAWYER *et al.*, 1960). Il augmente dans le sang sous l'effet de divers facteurs (pyrexal, acide nicotinique) (VON KAULLA, 1958 ; WEINER *et al.*, 1958), mais son origine est encore obscure. Toutefois, dans certaines conditions, sa provenance tissulaire paraît certaine ; il en est ainsi en cas de cancer de la prostate. Il pourrait enfin se trouver libéré dans la circulation à partir des parois vasculaires, sous des influences diverses : anoxémie, exercice, injection d'épinéphrine, électrochoc (SHERRY, FLETCHER et ALKJAERSIG, 1959).

On retrouve cet activateur dans le lait, les larmes, la salive, les sécrétions séminales. Il pourrait jouer un rôle dans le maintien de la perméabilité des canaux excréteurs et dans certains aspects de la physiologie de la reproduction.

Au cours du processus de la coagulation, il est adsorbé du plasma par la fibrine.

c) **Urokinase.** — L'urokinase est un activateur du système fibrinolytique présent dans l'urine (ASTRUP et STERNDOFF, 1952 ; SOBEL *et al.*, 1952 ; WILLIAMS, 1951). Le mécanisme de sa production demeure toujours obscur. Selon certains auteurs, elle serait synthétisée par le parenchyme rénal et l'épithélium des voies urinaires. Pour d'autres, ce serait un produit d'excrétion de l'activateur sanguin. Plaide d'ailleurs en ce sens le parallélisme des taux d'activateur dans le sang et dans l'urine chez des patients atteints d'affections variées, ainsi que l'ont montré VON KAULLA *et al.* (1960). Ils notent une faible activité dans les urines de malades atteints de thrombophlébite à répétition, une nette augmentation du taux d'activateur urinaire chez des patients soumis à une intervention chirurgicale, sous circulation extra-corporelle, se

complicant d'acidose. Pour ces auteurs, la vitesse d'excrétion de l'activateur dans l'urine serait le reflet de l'activité fibrinolytique existant dans le sang circulant.

L'urokinase est le seul activateur du plasminogène, d'origine humaine, qui ait pu être hautement purifié (PLOUG et KJELDGAARD, 1957 ; KJELDGAARD et PLOUG, 1957). L'activation de plasminogène humain par cette substance permet d'obtenir une préparation de fibrinolysine d'origine strictement humaine injectable à l'homme.

La présence d'urokinase dans les voies urinaires pourrait, dans certains cas, expliquer l'apparition d'hématurie ou, tout au moins, la persistance de ce symptôme au cours d'affections d'étiologies variées.

d) **Trypsine.** — L'activation par la trypsine doit être également mentionnée, car elle pourrait jouer un rôle dans les fibrinolyse compliquant les affections pancréatiques.

e) **Autres activateurs.** — Ceux-ci, d'origine exogène, comprennent en premier lieu la **streptokinase**, protéine extraite des filtrats de cultures de streptocoques β -hémolytiques (TILLET et GARNER, 1933). Cet enzyme bactérien ne peut, à lui seul, activer le plasminogène : il doit en premier lieu réagir avec un proactivateur présent dans le sang humain, mais absent chez d'autres mammifères (MÜLLERTZ, 1955 ; MÜLLERTZ et LASSEN, 1953 ; TROLL et SHERRY, 1955), notamment chez le rat. L'existence de ce proactivateur est cependant contestée par certains auteurs. L'application de la streptokinase à la thérapeutique des accidents thrombo-emboliques sera discutée ultérieurement (4^e partie).

La **staphylokinase**, autre activateur d'origine microbienne, provient des filtrats de culture de certains staphylocoques (GERHEIM *et al.*, 1948). Contrairement à la streptokinase, elle ne nécessite pas la présence d'un proactivateur pour transformer le plasminogène.

L'**activation peptonique**, particulièrement marquée dans des sérums de cobaye et de chien, n'existe pas chez l'homme (UNGAR et MIST, 1949).

D'autres substances sont capables de produire une activation similaire de la profibrinolysine. Citons l'héparine, l'acide hyaluronique, le sulfate de dextran (OLESEN, 1959). Il faut encore rappeler que le plasminogène peut être activé par un mécanisme encore mal connu à la suite de réactions antigènes-anticorps ou « anaphylactoïdes » pratiquées *in vitro* (UNGAR *et al.*, 1953) et *in vivo* (SALMON et LECOMTE, 1963), phénomène dont l'étude sera largement développée dans le présent travail.

En conclusion, l'activation du plasminogène peut se faire de différentes façons. Ces diverses possibilités varient d'une espèce animale à l'autre.

3. La plasmine ou fibrinolysine.

La plasmine est l'enzyme actif résultant de l'activation du plasminogène. Cette transformation s'accompagne d'une réduction d'environ 25 % de la taille de la molécule.

L'enzyme protéolytique ainsi obtenu n'est pas spécifique de la seule fibrine : en effet, la plasmine est capable d'hydrolyser le fibrinogène, le facteur V, le facteur VIII, l'ACTH, l'hormone de croissance, le glucagon ainsi que d'autres substrats protéiques parmi lesquels : la gélatine, la caséine, la β -lactoglobuline (SHERRY, FLETCHER et ALKJAERSIG, 1959).

Enfin, elle peut hydrolyser certains esters de la lysine et de l'arginine (TAMe, BAMe, LEe, LMe) (TROLL, SHERRY et WACHMAN, 1954). Toutefois, le mécanisme de cette action demeure controversé.

Si selon certains auteurs, elle détruit le complément, avec P-H. LAMBERT nous n'avons pas trouvé de réduction du taux de complément circulant chez des patients soumis à une fibrinolyse thérapeutique hautement efficace (LAMBERT et SALMON, 1962).

L'action de la plasmine sur la fibrine et le fibrinogène dépend de la composition du milieu. Ces deux substances purifiées et dissoutes en liquide physiologique tamponné, sont dégradées selon la même cinétique : dans les premières minutes, la fibrinolysine libère des fragments de grosse dimension qui, dans les heures suivantes, sont scindés en polypeptides. Ces constatations d'ordre biochimique seront d'ailleurs confirmées par nos études immunochimiques (chapitre 1, page 149). En milieu plasmatique, les phénomènes se déroulent de façon différente (ALKJAERSIG *et al.*, 1959 a). En effet, la fibrine est alors plus rapidement dégradée que le fibrinogène, tant *in vitro* qu'*in vivo*. Il est d'ailleurs possible d'observer une fibrinolyse sans fibrinogénolyse associée. Cet état s'explique par l'action des anti-plasmines qui neutralisent rapidement l'action de la fibrinolysine libre dans le milieu plasmatique alors que, dans le caillot, les phénomènes se déroulent de façon très différente. La fibrine y adsorbe, en effet, de grandes quantités de plasminogène, mais non les inhibiteurs de l'enzyme. De plus, la fibrine pourrait dissocier le complexe plasmine-anti-plasmine, et libérer la protéase active (AMBRUS et MARKUS, 1960).

4. Inhibiteurs du système fibrinolytique.

Deux inhibiteurs sont connus ; ce sont les anti-activateurs et les anti-plasmines. Ils agissent soit au niveau de processus d'activation du plasminogène, soit au niveau de la fibrinolysine (Tableau II).

TABLEAU II



INHIBITEURS DU SYSTÈME FIBRINOLYTIQUE

a) **Les inhibiteurs de l'activation.** — Des inhibiteurs de l'activation du plasminogène en plasmine existent dans le plasma humain. Leur nature est toujours inconnue, sauf celle des **anti-streptokinases**, qui sont des anticorps induits par l'injection de streptokinase ou par les infections streptococciques. L'intervention de ces inhibiteurs ne sera envisagée que lors de l'étude des fibrinolyse induites artificiellement dans un but thérapeutique.

L'**acide ε -aminocaproïque** retiendra davantage notre attention. Cette substance, dont l'activité antifibrinolytique a été découverte par des auteurs japonais (ABE et SATO, 1958), inhibe de façon compétitive l'activation du plasminogène par la streptokinase, l'urokinase ou l'activateur tissulaire (ALKJAERSIG, FLETCHER et SHERRY, 1959 b). Son activité anti-plasmine est beaucoup plus faible.

Au cours du présent travail, nous découvrirons de nouvelles indications de cet agent anti-fibrinolytique à la fois dans le domaine de l'expérimentation animale et dans celui de la thérapeutique de certains syndromes hémorragiques.

b) **Les anti-plasmines.** — La plasmine est inhibée par le sérum humain. Le phénomène présente deux phases : une première, rapide, et une seconde, lente (NORMAN, 1958 ; NORMAN et HILL, 1958) qui sont attribuées à deux inhibiteurs distincts.

Le premier est une α_2 -globuline ; le second est une α_1 -globuline. Ces substances existent en quantité importante dans le torrent circulatoire pouvant y neutraliser immédiatement la fibrinolyse qui y serait libérée.

Toutefois, l'inhibition de la fibrinolyse paraît réversible : le complexe plasmine-inhibiteur serait dissociable en présence de fibrine (AMBRUS et MARKUS, 1960). C'est ainsi que pourrait s'expliquer la thrombolyse sans activité fibrinolytique importante dans le sang circulant.

Les plaquettes pourraient également jouer le rôle d'anti-plasmine (JOHNSON et SCHNEIDER, 1953). L'absence de l'anti-fibrinolyse plaquettaire dans les thrombopénies expliquerait partiellement, selon certains, les tendances hémorragiques de diverses thrombopénies (STEFANINI et MURPHY, 1956).

On connaît en plus d'autres substances de nature polypeptidique exerçant l'effet d'anti-plasmine ; ce sont : l'« **inhibiteur de FREY et WERLE** » (Trasylol BAYER) (FREY, KRAUT et WERLE, 1950), extrait de glandes parotides de bœuf, et l'« **inhibiteur de KUNITZ et NORTHROP** » (1936) (Iniprol CHOAY), extrait de pancréas de bœuf. Ces produits

jouent essentiellement un rôle dans la thérapeutique des accidents fibrinolytiques.

L'**inhibiteur de soja** (BOWMAN, 1944) est une anti-plasmine d'origine végétale qui possède malheureusement des propriétés anticoagulantes (TAGNON et SOULIER, 1946). Il ne peut donc être utilisé *in vivo*. Nous l'avons employé dans certains de nos essais pour arrêter la dégradation du fibrinogène et de la fibrine par la plasmine *in vitro* (chapitre 1, p. 151.)

Les inhibiteurs du système fibrinolytique, que ce soient les anti-activateurs ou les anti-plasmines, sont donc soit d'origine endogène, c'est-à-dire produits par l'organisme lui-même, soit d'origine exogène : animale, végétale ou synthétique.

CHAPITRE II

MESURE DE L'ACTIVITÉ DU SYSTÈME FIBRINOLYTIQUE

ETANT donné la multiplicité des substances sur lesquelles le système fibrinolytique peut agir, il existe diverses méthodes pour mesurer son activité. Elles utilisent comme substrat soit le sang ou une fraction du sang du patient, soit un substrat étranger, protéique (fibrine généralement bovine, caséine, gélatine) ou synthétique (esters d'acide aminé).

A. TECHNIQUES UTILISÉES

1. Lyse du caillot de sang total.

Cette technique, la plus ancienne, est exécutée soit avec du sang prélevé sans anticoagulant, soit avec, du sang citraté ou oxalaté, puis additionné de thrombine. Peu sensible, elle ne pourra déceler que des fibrinolyse intenses.

En effet, normalement, le caillot incubé à 37° n'est dissous qu'après plus de 24 heures.

Afin de sensibiliser la méthode, certains auteurs (FEARNLEY *et al.* 1957) diluent le sang dans un tampon, ce qui, l'expérience le montre, diminue davantage l'action des inhibiteurs que celle des activateurs. Cette technique ne mesure donc plus exactement l'activité du système fibrinolytique tel qu'il existe *in vivo*.

2. Lyse du caillot de plasma.

Les modalités de cette technique (MACFARLANE et BIGGS, 1946) sont identiques à celles décrites ci-dessus pour le sang total. Toutefois

l'élimination des éléments figurés du sang rend malaisée l'interprétation du dosage, car les globules rouges et blancs jouent peut-être un rôle dans les processus d'activation et d'inhibition de la fibrinolyse ; de toute façon, les plaquettes renferment un inhibiteur de cette activité.

3. Lyse du caillot d'euglobulines.

Cette méthode, vraisemblablement la plus répandue vu la facilité de son exécution et la rapidité de sa réponse, consiste à précipiter certains éléments du plasma par de l'eau distillée acidifiée, soit par de l'acide acétique, soit par l'anhydride carbonique (KOWALSKI *et al.*, 1959 ; von KAULLA et SCHULTZ, 1958). Le précipité obtenu est redissous dans un tampon véronal et coagulé par la thrombine. Le précipité en milieu acide ne renferme pas les inhibiteurs. De la sorte, le caillot d'euglobulines provenant d'un individu normal se lyse en plus de 5 heures.

Les critiques énoncées pour les méthodes précédentes s'appliquent également à ce test. De plus, les résultats de cette épreuve doivent être prudemment interprétés, car ils dépendent de plusieurs facteurs : la teneur du précipité en fibrinogène, en plasminogène et en activateur. Ainsi en cas d'hypofibrinogénémie, le caillot peut se lyser très rapidement alors que le système fibrinolytique n'est cependant pas anormalement actif. Le dosage du fibrinogène ou l'addition de cette substance au précipité d'euglobulines avant coagulation permettra de reconnaître cette éventualité.

D'autre part, l'absence de dissolution ou la lyse anormalement lente du caillot d'euglobulines peut être la conséquence d'un manque de plasminogène ou d'activateur. L'addition de plasminogène à la solution d'euglobulines avant sa coagulation permet de choisir entre ces deux alternatives. Dans le premier cas, mais non dans le second, elle a pour conséquence d'accélérer la lyse.

4. Plaques de fibrine.

Afin de pouvoir étudier de façon plus précise l'intensité de l'activité fibrinolytique, ASTRUP et MÜLLERTZ (1952) ont mis au point une méthode simple, basée sur la mesure de la zone d'un film de fibrine digérée par la préparation étudiée, après une période d'incubation de 18 heures à 37°. C'est la « **fibrin plate method** ». Cette technique, de réalisation aisée,

permet de travailler à l'aide d'un substrat standard, avantage majeur par rapport aux tests antérieurs. Son principe est le suivant : du fibrinogène bovin *, dissous en milieu tamponné au pH 7,4 par le véronal, est coagulé par de la thrombine dans une boîte de PETRI. Le volume de solution utilisé étant fixe et les boîtes ayant un même diamètre, la couche de fibrine aura une épaisseur constante. Sur ce caillot, on dépose 0,03 ml de la préparation examinée : soit le plasma, soit la solution d'euglobulines précipitées et redissoutes, soit encore tout autre liquide biologique.

Il convient de remarquer que la lyse du caillot de fibrine peut être due non seulement à la fibrinolysine présente dans le matériel biologique étudié, mais aussi à la fibrinolysine qui peut se former *in vitro* par réaction entre les activateurs du matériel examiné et le plasminogène qui contamine toujours les préparations de fibrinogène utilisées pour former les caillots.

Il est cependant possible de dissocier l'effet de ces fibrinolysines d'origine différente. Il suffit de détruire le plasminogène contaminant les caillots par un chauffage des plaques de fibrine à 80°, pendant 30 minutes (LASSEN, 1952). En utilisant systématiquement une plaque chauffée et une plaque non chauffée, on pourra distinguer l'effet de la fibrinolysine présente dans l'échantillon testé et celui des activateurs. En effet, la fibrinolysine libre dissout la fibrine chauffée, substrat sur lequel les activateurs sont sans effet. Elle détruit, bien entendu, la fibrine normale, mais celle-ci subira en plus la lyse sous l'influence des activateurs qui transforment en plasmine le plasminogène contenu dans le caillot.

La valeur de cette intéressante technique est cependant limitée par sa faible sensibilité et par la lenteur de sa réponse. Elle sera choisie pour déceler les activités thrombolytiques intenses.

5. Dissolution du caillot marqué à l'iode radioactif.

Afin de reproduire au mieux les conditions physio-pathologiques, ALKJAERSIG, FLETCHER et SHERRY (1959 a) ont mis au point un test qui consiste à incuber, dans le milieu étudié, un caillot standard marqué à l'¹³¹I. L'épreuve est exécutée de la façon suivante : du plasma stock, additionné de fibrinogène marqué à l'iode radioactif, est introduit

* Nous utilisons le fibrinogène POVIET. Notre solution renferme 1,25 g/litre de fibrinogène coagulable.

dans un tube contenant une anse métallique. Après coagulation du mélange par addition de thrombine, le caillot est retiré à l'aide du fil qu'il emprisonne et soigneusement lavé. Il est ensuite incubé à 37° pendant 2 heures dans le plasma étudié, non dilué, où il subit éventuellement une dissolution plus ou moins étendue. L'activité fibrinolytique est mesurée en dosant la radioactivité dans le liquide restant après que le caillot résiduel adhérent au fil a été retiré. Comme dans la méthode précédente, il y a lieu de considérer les effets de la fibrinolysine présente comme telle au départ dans le plasma étudié, et ceux de la fibrinolysine que les activateurs de ce plasma ont éventuellement formée *in vitro* soit à partir du plasminogène du plasma étudié, soit de celui du caillot. Le chauffage à 80° pendant 30 minutes permet d'éliminer le plasminogène du caillot. Cette méthode très sensible a permis de démontrer l'existence d'un activateur du plasminogène dans le sang d'individus normaux (SAWYER *et al.*, 1960). Une modification simplifiée a été proposée par DUDOK DE WIT *et al.* (1962) ; elle permet son utilisation régulière en clinique.

6. Lyse du caillot marqué à l'aide d'un indicateur fluorescent.

S'inspirant de la technique du caillot marqué à l'iode radioactif, divers auteurs (LÜSCHER et KÄSER-GLANZMANN, 1961 ; PAPENHAGEN *et al.*, 1962) ont préconisé le marquage du fibrinogène au moyen d'un radical fluorescent. Cette méthode, dont le principe est identique à celui de la précédente, est réalisée à l'aide de fibrinogène couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine ou à un dérivé de rhodamine. Le caillot marqué est incubé pendant un certain temps dans le liquide étudié où il subit une digestion plus ou moins importante. Après l'en avoir retiré, on mesure la fluorescence du liquide résiduel qui est fonction de l'activité fibrinolytique de la préparation. Malheureusement, cette technique n'est pas applicable au plasma qui présente déjà spontanément une certaine fluorescence en lumière ultra-violette.

7. Test à la caséine.

En raison du spectre protéolytique large de la fibrinolysine, d'autres substrats protéiques ont été proposés pour son dosage, en particulier la caséine et la gélatine. C'est la caséine qui est la plus utilisée actuelle-

ment. Son intérêt réside dans le fait qu'elle ne contient pas de profibrinolysine. Elle permet donc de doser uniquement la fibrinolysine et non les activateurs. Toutefois, la digestion de la caséine étant fortement entravée par les inhibiteurs plasmatiques, ce substrat ne convient que pour l'étude de systèmes purifiés.

8. Substrats synthétiques.

TROLL, SHERRY et WACHMAN (1954) ont constaté que la fibrinolysine hydrolyse certains esters d'acides aminés, tels le tosyl arginine méthyl ester (TAMe), le benzoyl arginine méthyl ester (BAMe), le lysine méthyl ester (LMe) et le lysine éthyl ester (LEe). Il faut savoir que le plasma possède d'autres activités estérasiques non imputables à la fibrinolysine. C'est la raison pour laquelle ces substances seront réservées à l'étude des systèmes purifiés, en particulier pour l'analyse de la cinétique des réactions enzymatiques.

9. La thrombo-élastographie.

Cette méthode permet d'étudier la fibrinolyse sur le sang natif. L'évolution du tracé thrombo-élastographique est fonction de l'activité fibrinolytique. En effet, la coalescence des deux courbes du tracé, apparaissant après la coagulation sanguine, dépend de l'action du système fibrinolytique (von KAULLA et WEINER, 1955). Cette technique donne un aspect cinétique du processus fibrinolytique (STAMM, 1962). Elle est malheureusement peu sensible et exige une période d'observation prolongée.

10. Dosage du fibrinogène.

La fibrinolysine attaquant non seulement la fibrine, mais également diverses autres substances intervenant dans la coagulation, et notamment le fibrinogène, la mesure du taux de ce dernier s'avère indispensable pour l'exploration des états fibrinolytiques.

Nous avons écarté les techniques basées sur les propriétés antigéniques du fibrinogène, car les produits de dégradation de cette substance, comme ceux de la fibrine d'ailleurs, sont précipités par le sérum anti-fibrinogène, ainsi que nous le verrons plus loin (3^e partie, chapitre I, page 149).

Nous avons adopté une méthode de dosage dérivée de la technique de CLAUSS : le « **Fibrin polymerisation test** » de VERMYLEN et al. (1962). On sait que cette technique est fondée sur la constatation que le temps de coagulation d'un plasma, en présence d'un excès de thrombine, est fonction de sa concentration en fibrinogène. Elle ne mesure cependant pas nécessairement la totalité du fibrinogène en solution, car la présence éventuelle de produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine inhibe la polymérisation des monomères de fibrine ; ceci a dès lors pour conséquence qu'une fraction du fibrinogène ne participe pas à la constitution du caillot. La méthode est toutefois intéressante en clinique, car elle dose la quantité de fibrinogène pouvant effectivement jouer un rôle dans l'hémostase.

Le dosage du fibrinogène dans les états fibrinolytiques se fera toujours sur du sang prélevé en présence d'un agent anti-fibrinolytique afin d'en éviter la dégradation par la plasmine libre.

L'étude immunochimique du fibrinogène, que nous développerons plus loin, permet d'en apprécier la dégradation. Nous renvoyons le lecteur à cette étude personnelle effectuée au chapitre 1, page 149.

B. EXPÉRIENCE PERSONNELLE

Parmi les diverses techniques décrites ci-dessus, nous en avons retenu cinq :

1. Nous dosons le fibrinogène. Il faut cependant rappeler que le taux de cette protéine ne s'abaisse qu'en présence d'une activité fibrinolytique très intense. Nous ne pratiquons ce test qu'en cas de fibrinolyse aiguë ou lors de la surveillance du traitement fibrinolytique.

2. Nous mesurons le temps de dissolution du caillot obtenu en sang pur et dilué en cas de fibrinolyse intense, et en particulier pour contrôler l'effet thrombolytique du traitement par la plasmine et la streptokinase (4^e partie, page 181). Rappelons que cette méthode n'est pas quantitative.

3. La mesure du temps de digestion des euglobulines, vu la simplicité et la rapidité de son exécution, nous permet de déceler en 1 à 2 heures une activité fibrinolytique anormale. Nous l'utilisons pour les besoins de la clinique, afin de confirmer rapidement un diagnostic d'accident fibrinolytique aigu.

4. Pour obtenir une notion quantitative de l'activité fibrinolytique et dissocier les effets des activateurs de ceux de la plasmine, nous employons la technique des plaques de fibrine, chauffées ou non. Cette méthode, malheureusement peu sensible, est utilisée pour nos essais cliniques et expérimentaux.

5. Afin de déceler les activités fibrinolytiques de faible intensité et pour obtenir une réponse rapide, nous développons actuellement la méthode utilisant les caillots marqués à l'iode radioactif, décrite par DUDOK DE WIT.

CONCLUSIONS

de la première partie

Afin de familiariser le lecteur au problème de la fibrinolyse, qui sera évoqué de diverses façons dans le présent travail, nous avons décrit brièvement les divers facteurs participant à la constitution du système fibrinolytique.

Ce système comprend des activateurs qui transforment un pro-enzyme — le plasminogène ou profibrinolysine — en enzyme actif — la plasmine ou fibrinolysine —. Cette dernière est un enzyme protéolytique au spectre large, mais dont les effets sont entravés, chez l'individu normal, par le jeu de divers inhibiteurs.

L'étude de l'intervention du système fibrinolytique, dans divers processus biologiques, implique l'utilisation de techniques mesurant son activité. Celles-ci sont variées : certaines permettent d'apprécier globalement le processus de fibrinolyse ; d'autres, réalisées à l'aide d'un substrat standard, mesurent de façon dissociée le taux des activateurs et celui de la plasmine libre. Parmi celles-ci, nous retiendrons, pour nos essais expérimentaux, la technique des plaques de fibrine d'ASTRUP.

DEUXIÈME PARTIE

PATHOGÉNIE
DU
PURPURA THROMBOPÉNIQUE

ROLE ÉVENTUEL DES ENZYMES FIBRINOLYTIQUES
DANS LA PATHOGÉNIE DE CETTE AFFECTION

INTRODUCTION

LE rôle joué par le facteur vasculaire dans le mécanisme complexe de l'hémostase apparaît particulièrement bien individualisé dans la pathogénie du purpura thrombopénique. C'est la raison pour laquelle l'étude de ce syndrome a fait l'objet de nos premières recherches.

A la suite des travaux de BEDSON (1921), puis de ROSKAM (1934), on sait que l'apparition des pétéchies dans les thrombopénies induites expérimentalement chez l'animal, dépend de deux facteurs. Ainsi s'exprime ROSKAM (1951) : « le purpura hémorragique par injection de sérum anti-plaquettes n'est pas qu'une maladie des plaquettes ; sa caractéristique principale, l'incoercibilité des saignements, relève certes de la thrombopénie, facteur sanguin, mais aussi d'un facteur périphérique, pariétal, vasculaire, l'angéiose parcellaire hémorragique ». Si la thrombopénie s'explique aisément par un simple phénomène immunologique aboutissant à la destruction des plaquettes, le mécanisme exact de la lésion vasculaire reste inconnu. Les essais de ces auteurs avaient suggéré l'existence d'antigènes communs aux plaquettes et aux parois vasculaires, hypothèse qui expliquerait l'action toxique des sérums anti-plaquettes envers l'endothélium par une banale réaction antigène-anticorps.

C'est à la recherche de ces antigènes communs supposés qu'ont été consacrées nos premières recherches. Elles ont été conduites de manière à identifier le plus grand nombre possible de substances d'origine plaquettaire pouvant jouer le rôle d'antigène chez le lapin, puis de rechercher leur présence éventuelle au niveau de l'endothélium vasculaire.

CHAPITRE I

RECHERCHE D'ANTIGÈNES COMMUNS AUX PLAQUETTES ET AUX PAROIS VASCULAIRES

A. ÉTUDE DES ANTIGÈNES PLAQUETTAIRES

La mise en évidence et l'identification des antigènes des thrombocytes ont été entreprises à l'aide de la précipitation en gel, soit par immunoelectrophorèse, soit par double diffusion.

1. Matériel.

a) **Espèces animales étudiées.** — Nous avons étudié surtout les plaquettes de l'homme, du bœuf et du rat, puis, dans une moindre mesure, celles du cheval, du mouton et du porc.

b) **Récolte du sang.** — Il est recueilli en présence d'oxalate sodique (1,34 % aq) ou de citrate trisodique (3,8 % aq) à raison de 9 volumes de sang pour 1 de la solution d'anticoagulant. Dans certains essais réalisés chez l'homme, le sang est récolté sur une solution du sel disodique de l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) à 1 % en NaCl aq à 0,85 % *, à raison de 9 parties de sang pour 1 de la solution décalcifiante.

c) **Isolement des plaquettes.** — Pour obtenir de grandes quantités de plaquettes, les éléments figurés du sang rendu incoagulable sont séparés par centrifugation de 30 minutes à 3.000 t. p.m. Le tapis de

* « Soluté physiologique » de la Pharmacopée Belge.

plaquettes et de leucocytes surmontant les hématies est aspiré à la pipette, fournissant ainsi une suspension plaquettaire enrichie, mais encore abondamment contaminée par des globules rouges et des leucocytes. Ces éléments sont alors suspendus dans au moins 20 fois leur volume de soluté physiologique renfermant 0,1 % d'éthylènediaminetétraacétate disodique et amené au pH 7,4 par addition de NaOH. Ils sont ensuite lavés 6 fois par centrifugation dans une quantité de ce même liquide au moins 20 fois égale à celle du culot. Les thrombocytes non agglutinés après ces 6 lavages, contrairement aux autres éléments qui les contaminent, ne sont pas sédimentés par centrifugation à faible vitesse et de courte durée. La centrifugation énergique du liquide surnageant fournit ensuite un culot plaquettaire qui est suspendu en NaCl à 0,85 % et lavé une dernière fois. Les plaquettes, qui ont donc été lavées 7 fois, sont reprises en suspension dans du soluté physiologique, généralement à la concentration de 2×10^6 éléments par mm^3 , et conservées en tubes siliconés, à la température de -20°C . Ces suspensions ne sont que très faiblement contaminées par des hématies et des leucocytes.

d) **Préparation des lysats plaquettaires.** — Les techniques immunologiques utilisant la précipitation en gel nécessitent l'utilisation d'un matériel soluble. Aussi les plaquettes ont-elles dû être détruites afin d'en libérer le matériel antigénique. Diverses méthodes ont été utilisées dans ce but : 1) congélations et décongélations successives dans un mélange de neige carbonique et d'acétone, 2) broyage au moyen de microbilles de verre dans l'appareil de MICKLE, 3) désintégration pendant 6 à 8 minutes dans le vibreur sonique RAYTHEON. Cet appareil nous donne les meilleurs résultats. Les lysats qu'on y obtient à partir d'une suspension titrant 2×10^6 plaquettes par mm^3 renferment, après séparation du matériel insoluble, 20 g de protéines par litre. Les extraits plaquettaires sont toujours préparés immédiatement avant leur utilisation et placés en verrerie siliconée. En effet, le contact du verre provoque très rapidement leur dénaturation. Lorsque les lysats sont obtenus par congélations et décongélations ou dans l'appareil de MICKLE, ils doivent être concentrés par évaporation. Pour ce faire, ils sont placés en boyau de cellophane, dont la partie inférieure, immergée en soluté physiologique, est soumise à la dialyse tandis que sa partie supérieure est balayée par un courant d'air provenant d'une soufflerie. Leur teneur en protéines est ainsi amenée entre 15 et 20 g par litre.

e) **Production des sérums anti-plaquettes.** — Tous les immunosérums utilisés dans cette étude ont été obtenus chez des lapins d'un poids

moyen de 2 kg. Quelques essais d'immunisation ont été tentés chez le coq, mais les immunosérums préparés chez cet animal ne paraissent pas convenir pour les techniques de précipitation en gel (SALMON, 1957).

Les lapins sont immunisés par voie intra-veineuse à raison de 4 injections par semaine pendant 4 à 8 semaines selon la réponse de l'animal à l'antigène injecté. Les quantités administrées sont de 0,5 ml la première semaine, 1 ml la deuxième, 1,5 ml la troisième et 2 ml les semaines suivantes. Onze ou 12 jours après la dernière injection, les animaux sont saignés à la carotide. Les sérums, décantés dès après rétraction du caillot, sont inactivés par un chauffage de 30 minutes à 56°, puis conservés à l'état congelé à -20° , en présence de merthiolate à la concentration finale de 1.10^{-4} .

Malgré l'immunisation prolongée, les sérums ainsi obtenus sont souvent trop pauvres en anticorps et donnent alors des images immuno-électrophorétiques d'interprétation difficile. Dans de tels cas, on précipite les γ -globulines par addition d'un demi-volume d'une solution saturée de sulfate ammonique. Le précipité obtenu est redissous en liquide physiologique et dialysé contre ce même liquide, de façon à débarrasser la préparation du sulfate ammonique. On concentre de la sorte les anticorps 10 ou 20 fois, selon les besoins.

Les activités des anti-sérums provenant de lapins différents se sont montrées quantitativement et qualitativement variables. Aussi, les avons-nous mélangés de façon à réaliser un réactif qui contient le plus grand nombre possible d'anticorps distincts.

f) **Sérum anti-fibrinogène.** — Il a été obtenu chez 3 lapins après injection d'une solution de fraction I de COHN renfermant 20 g de fibrinogène par litre. Les injections sont faites dans une veine de l'oreille, selon le schéma utilisé pour les plaquettes, pendant 4 semaines. Les animaux sont saignés 11 jours après la dernière injection. Les nombreux anticorps correspondant à de multiples protéines plasmatiques que renferme cet anti-sérum sont précipités par addition de sérum humain récolté immédiatement après coagulation. Le précipité est éliminé par centrifugation. L'expérience montre que 0,5 ml de sérum humain pour 1 ml d'anti-sérum précipitent tous les anticorps anti-protéines sériques de notre sérum anti-fraction I de COHN. Un éventuel excès d'antigène n'interfère d'ailleurs pas avec le but que nous poursuivons.

g) **Sérum anti-sérum humain.** — Nous avons utilisé du sérum de cheval anti-sérum humain de l'Institut PASTEUR (lot : Ch 491).

2. Techniques immunologiques.

La structure antigénique des plaquettes a été étudiée à l'aide de 4 groupes de techniques : précipitation en milieu liquide, précipitation en gélose, analyse immunoélectrophorétique, épreuve d'agglutination plaquettaire.

a) Pour l'étude des précipitines en milieu liquide, nous utilisons la technique de précipitation interfaciale, connue sous le nom de « **ring-test** ». Cette méthode, qui consiste à superposer, sans les mélanger, les solutions d'anticorps et d'antigènes, est certes grossière. Elle permet toutefois d'apprécier la teneur en anticorps des immunsérums et de contrôler l'élimination de certains anticorps précipitants.

b) La **double diffusion en gélose**, connue sous le nom de technique d'OUCHTERLONY (1948), permet de comparer entre eux des antigènes ou des anticorps variés et, éventuellement, d'identifier les antigènes inconnus d'un mélange à l'aide de préparation d'antigènes purs. Elle est également des plus utiles pour étudier les réactions croisées auxquelles divers antigènes peuvent donner lieu.

Pour la réaliser, nous utilisons du liquide physiologique ajusté au pH 7,4 par les tampons phosphates de SÖRENSEN, et gélosé par l'addition de 1,5 % d'agar « NOBLE » DIFCO. Cette gélose, additionnée de merthiolate à la concentration de 1.10^{-4} , est coulée en boîtes de PETRI de 10 cm de diamètre, de façon à obtenir une couche épaisse de 4 à 5 mm. On y creuse à l'emporte-pièce des cuvettes cylindriques de 1 cm de diamètre. Celles-ci sont disposées en couronne autour d'une cuvette centrale contenant généralement l'anti-sérum, les antigènes étudiés étant alors répartis dans les cuvettes périphériques. Cette disposition est inversée si l'on veut comparer les effets de plusieurs anti-sérums sur un même antigène. Ces boîtes de PETRI sont conservées en atmosphère humide à la température de la chambre. On y suit l'évolution des précipitations pendant 3 à 4 semaines.

Afin d'obtenir une réponse plus rapide et d'économiser les anti-sérums, nous utilisons plus fréquemment une micro-méthode décrite par SCHEIDEGGER *et al.* (1957). Elle est réalisée de la même façon en coulant 2 ml de gélose sur une lame porte-objet. Les cuvettes sont creusées à l'aide d'une aiguille à ponction pleurale dont le biseau a été abrasé. Chaque lame porte-objet peut ainsi porter 3 groupes de 6 cuvettes. Les lectures sont effectuées après 24 heures d'incubation à la température du laboratoire. Les lames couvertes de gélose sont alors lavées

pendant 3 à 4 heures en liquide physiologique, de façon à éliminer du gel les protéines non précipitées par la réaction antigène-anticorps. Elles sont ensuite recouvertes d'une feuille de papier-filtre, séchées, puis enfin colorées par séjour de 3 minutes dans une solution composée de 9 volumes de méthanol, un volume d'acide acétique glacial, 1 g d'amidoschwarz par litre de solvant. Elles sont enfin lavées dans le solvant, puis séchées.

c) **L'analyse immunoélectrophorétique**, développée par GRABAR et WILLIAMS (1955), combine la simple électrophorèse en gel et la double diffusion en gélose. Elle permet de caractériser une substance à la fois par ses propriétés immunochimiques et par sa mobilité électrophorétique.

Nous utilisons généralement une variante de cette technique : la micro-immunoélectrophorèse décrite par SCHEIDEGGER (1955) qui permet de lire les diagrammes immunoélectrophorétiques après 18 heures, tandis que la méthode de GRABAR et WILLIAMS exige des délais de 5 à 6 jours. Elle se réalise sur lame porte-objet avec un gel contenant 1,5 % d'agar « NOBLE » DIFCO dans une solution de véronal sodique de force ionique $\mu = 0,05$, et dont le pH est amené à 8,2 par addition de HCl. Le tampon des vases électrodes a une force ionique double. On applique une tension de 40 V aux extrémités des lames. La durée de l'électrophorèse est de 35 minutes. Celle-ci terminée, on creuse dans le gel des cuvettes allongées, parallèles à l'axe de migration électrophorétique.

Ces tranchées sont alors remplies de l'anti-sérum étudié en quantité variable selon la richesse en anticorps. Dans nos conditions expérimentales, elle a été comprise entre 10 et 60 mm³.

Les lames sont ensuite mises en incubation en atmosphère humide pendant 18 heures à la température de la chambre afin que se réalise la précipitation immunologique. Les anticorps diffusant sur un front perpendiculaire à l'axe de migration électrophorétique, rencontrent les antigènes homologues qui, séparés par l'électrophorèse, diffusent. chacun radiairement dans le gel à partir de la zone où ils sont localisés. La précipitation a lieu là où antigène et anticorps se rencontrent en concentrations équivalentes, chaque système antigène-anticorps donnant ainsi un précipité sous forme d'un trait arciforme. Le nombre de traits correspond au nombre minimum d'antigènes contenus dans le matériel étudié et dont les anticorps se trouvent dans l'anti-sérum utilisé.

Après un lavage de 3 à 4 heures en liquide physiologique, afin d'éliminer les protéines non précipitées, les lames sont séchées à l'aide

de papier-filtre, puis colorées dans la solution d'amidoschwarz comme après la double diffusion en gélose (voir b ci-dessus).

d) L'**activité agglutinante** des divers immunsérums envers les thrombocytes a été recherchée en mettant en présence 0,2 ml d'une suspension de plaquettes fraîchement isolées et lavées 4 fois et 0,2 ml de dilutions variées de l'immunsérum étudié, inactivé par chauffage à 56° pendant 30 minutes et additionné d'oxalate sodique à la concentration finale de 1,34 ‰. Après une heure d'incubation à la température du laboratoire, ces suspensions sont examinées entre lame et lamelle, au microscope à contraste de phase, pour déterminer la dilution limite qui assure encore l'agglutination. Précisons que la microscopie en contraste de phase permet de différencier aisément la simple agglutination immunologique, de la confluence intime qui caractérise la métamorphose visqueuse des plaquettes. Les mesures effectuées après 3 ou 6 heures fournissent des titres d'agglutination identiques à ceux qu'on observe après 1 heure.

3. RESULTATS : I. Etudes des plaquettes humaines.

1) Plaquettes et protéines plasmatiques.

Lorsque le lysat plaquettaire obtenu au moyen de plaquettes lavées 7 fois est soumis à l'analyse imm.électr. révélée par le sérum anti-plaquettes utilisé brut, on voit apparaître des lignes de précipitation qui correspondent à des antigènes ayant des mobilités électrophorétiques variées, allant de celle de l'albumine à celle des γ -globulines (fig. 1). Si le sérum anti-plaquettes est débarrassé des anticorps qui précipitent le sérum humain, il ne réagit plus, dans les conditions expérimentales

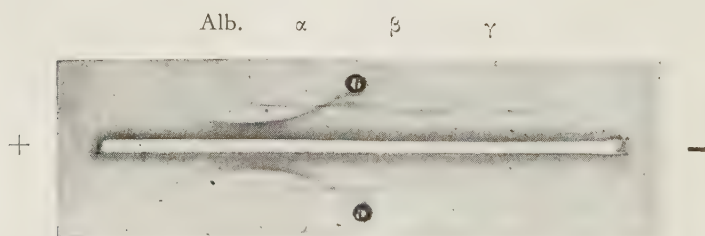


FIG. 1. Analyse immunoélectrophorétique d'un lysat de plaquettes humaines, à l'aide d'un sérum de lapin anti-plaquettes humaines utilisé brut.

utilisées, qu'avec 3 antigènes du lysat plaquettaire ayant des mobilités d' α et β -globulines (fig. 2).

Si l'on fait agir le sérum anti-plaquettes brut sur du plasma ou du sérum soumis à l'analyse imm.électr., on note l'apparition de nombreux traits de précipitation (fig. 3).

Enfin, le sérum de cheval anti-sérum humain précipite plusieurs antigènes dans le lysat de plaquettes lavées 7 fois, voire 10 fois (fig. 4).

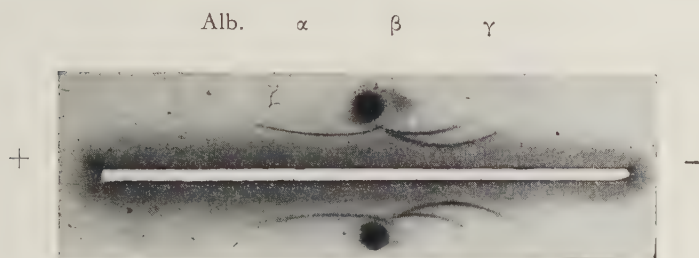


FIG. 2. Analyse immunoélectrophorétique d'un lysat de plaquettes humaines, à l'aide d'un sérum de lapin anti-plaquettes humaines, dont les anticorps anti-protéines sériques ont été précipités par du sérum humain.

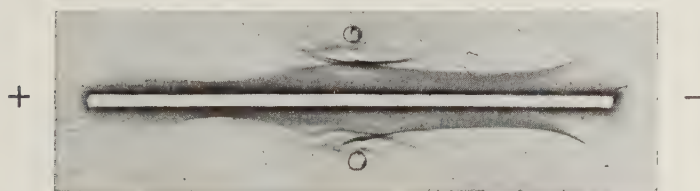


FIG. 3. Analyse immunoélectrophorétique d'un plasma humain, à l'aide d'un sérum de lapin anti-plaquettes humaines, utilisé brut.



FIG. 4. Analyse immunoélectrophorétique d'un lysat de plaquettes humaines à l'aide d'un sérum de cheval anti-sérum humain (ch. 491).

Ces recherches, exposées en détail dans divers travaux antérieurs (SALMON, 1958 a et b), nous ont permis de conclure que les plaquettes humaines, parfaitement isolées, lavées 7 et même 10 fois, sont porteuses de diverses protéines plasmatiques. Parmi celles-ci, nous avons pu identifier le fibrinogène, l'albumine, les γ -globulines, l'haptoglobine, la sidérophiline, la β_2 -macroglobuline (fig. 5).

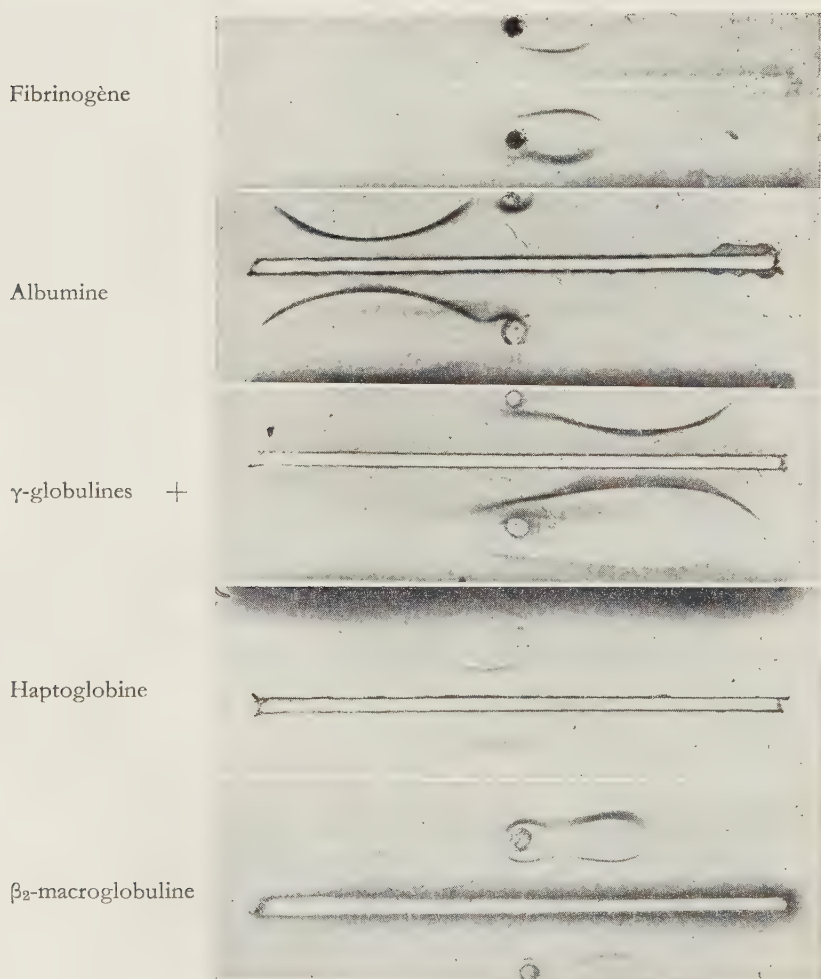


FIG. 5. Diagrammes immunoélectrophorétiques obtenus avec diverses protéines plasmatiques purifiées, révélés chacun par du sérum de lapin anti-plaquettes humaines utilisé brut.

Ces protéines semblent fermement fixées aux plaquettes. En effet, quel que soit le pH du liquide utilisé (5,3 - 6,0 - 7,4 ou 8,0), les protéines sériques ne peuvent y être généralement décelées (par analyse imm.électr. à l'aide du sérum de cheval anti-sérum humain) à partir du 6^e lavage, même après concentration de 20 fois par évaporation (fig. 6).

Les protéines plasmatiques liées aux plaquettes constituent, avec les divers facteurs de coagulation y décelés par BOUNAMEAUX (1957), ce que ROSKAM (1923) a appelé « l'atmosphère plasmatique péri-plaquettaire ».

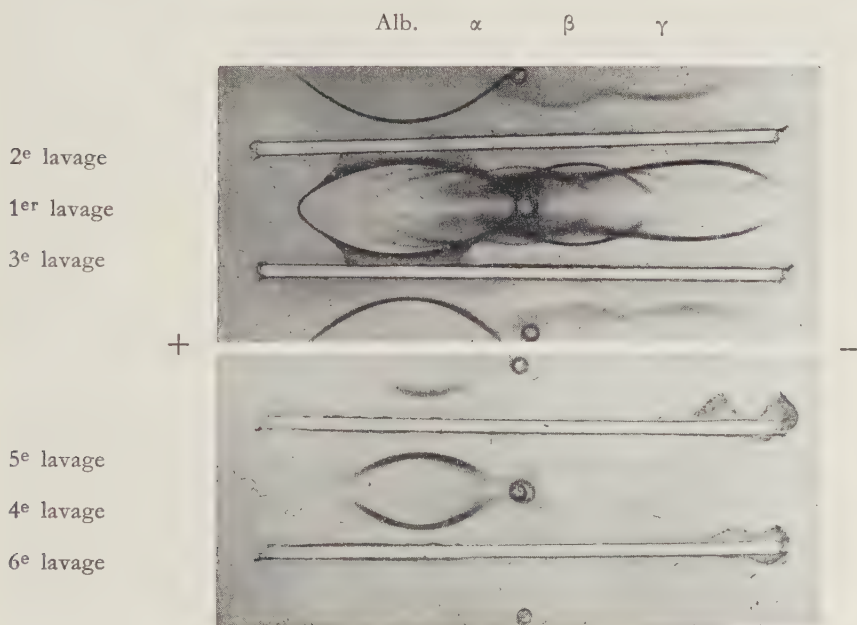


FIG. 6. Analyse immunoélectrophorétique des 6 premiers liquides de lavage des plaquettes, qui ont été concentrés 20 fois par évaporation, la précipitation étant réalisée à l'aide du sérum de cheval anti-sérum humain (ch 491).

Noter la disparition de tout précipité dans le diagramme obtenu avec le liquide du 6^e lavage.

2) Situation des protéines plasmatiques au niveau des plaquettes.

Selon ROSKAM (1923), les protéines constituant l'atmosphère plasmatique péri-plaquettaire seraient adsorbées à la surface des thrombocytes. Toutefois, avec BOUNAMEAUX (1958), nous avons constaté

que le sérum anti-fibrinogène ne détermine qu'une faible agglutination plaquettaire, alors qu'en présence du lysat de ces thrombocytes, soumis à la précipitation en gélose ou à l'analyse imm.électr., cet immun-sérum provoque une ligne de précipitation intense. De plus, un échantillon de plaquettes lysées s'avère capable de précipiter les anticorps d'un sérum anti-fibrinogène, alors que la même quantité de plaquettes intactes ne détermine qu'une chute partielle du taux de ces anticorps.

Ces recherches nous ont mené à considérer que le fibrinogène est essentiellement localisé plus ou moins profondément à l'intérieur des thrombocytes. Cette opinion vient d'ailleurs d'être confirmée par SOKAL (1962) à l'aide des techniques d'immunofluorescence. D'autre part, pour réaliser le test de COOMBS plaquettaire et celui de consommation de l'anti-globuline, on utilise généralement des thrombocytes lavés 4 fois (DAUSSET, 1956). Or le sérum anti-globuline, mis au contact de plaquettes normales, ne les agglutine généralement pas. Ce fait nous incite aussi à penser que les γ -globulines présentes au niveau des plaquettes, même lavées 7 fois, sont situées à l'intérieur de ces éléments.

3) Fixation des protéines plasmatiques aux plaquettes.

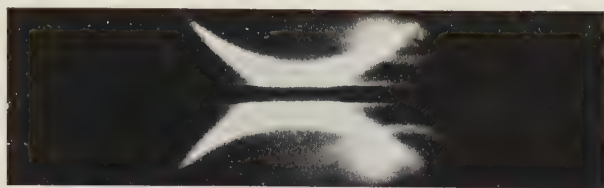
Une suspension de plaquettes humaines lavées 6 fois, a été mise à incuber dans une solution d'albumine marquée à l'iode radioactif renfermant 0,3 mg de protéine par ml. Après un séjour de 2 heures à 37°C, puis d'une nuit en glacière, ces plaquettes sont à nouveau lavées 7 fois et leur concentration ramenée à la valeur initiale. Elles sont ensuite lysées par congélations et décongélations successives dans un mélange d'acétone et de neige carbonique.

Le lysat, concentré 10 fois par évaporation, est soumis à l'analyse imm.électr., la révélation étant effectuée par le sérum de cheval anti-sérum humain. Séchées et colorées, les plaques immunoélectrophorétiques ont été mises au contact d'un film radiographique pendant 10 jours. A titre de contrôle, la solution d'albumine marquée a subi le même traitement immunoélectrophorétique.

Comme le montre la figure 7, le trait de précipitation correspondant à l'albumine et induit par le lysat de plaquettes incubées dans les solutions radioactives, impressionne le film radiographique comme le fait le trait induit par la solution d'albumine marquée.

Ces résultats permettent d'affirmer que, mises en présence d'albumine, les plaquettes humaines fixent cette protéine de façon tenace.

Albumine



Lysat de plaquettes

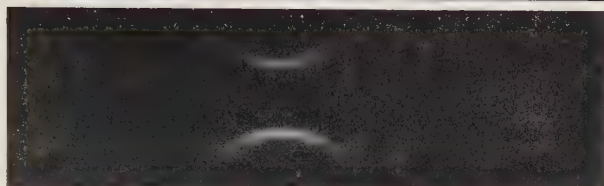


FIG. 7. Auto-radiographies des analyses imm. électr. obtenues avec une solution d'albumine marquée à l'iode radioactif et avec un lysat de plaquettes, qui ont été incubées dans cette solution d'albumine, puis lavées 7 fois, la précipitation étant réalisée à l'aide du sérum de cheval anti-sérum humain (ch 491).

Semblable expérience a été réalisée à l'aide de γ -globulines marquées à l'I¹³¹. Les résultats furent identiques à ceux de l'expérience précédente.

Enfin, mises en présence de plasma provenant d'un malade atteint de macroglobulinémie, les plaquettes humaines absorbent la paraprotéine. Le lysat de ces plaquettes, lavées après incubation dans le plasma pathologique, donne, à l'analyse imm.électr. révélée par le sérum de cheval anti-sérum humain, un diagramme caractérisé par la présence du trait β_2 M (fig. 8), ligne qui est évidemment absente dans les diagrammes obtenus avec les plaquettes témoins.

Chez les patients atteints de dysprotéinémie (cirrhose, macroglobulinémie, myélome, agammaglobulinémie, afibrinogénémie), nous avons retrouvé la tare plasmatique dans le diagramme immunoélectrophorétique du lysat de plaquettes lavées (fig. 9).

Les plaquettes sont donc capables d'absorber, de façon tenace, des protéines plasmatiques tant normales que pathologiques.

MIESCHER *et al.* (1960) ont récemment montré que les plaquettes absorbent également les complexes antigène-anticorps solubles présents dans le torrent circulatoire, et en déduisent une théorie expliquant la thrombopénie qui accompagne les phénomènes anaphylactiques. Selon eux, les plaquettes seraient entraînées passivement lors de la réaction antigène-anticorps se déroulant dans le torrent circulatoire.

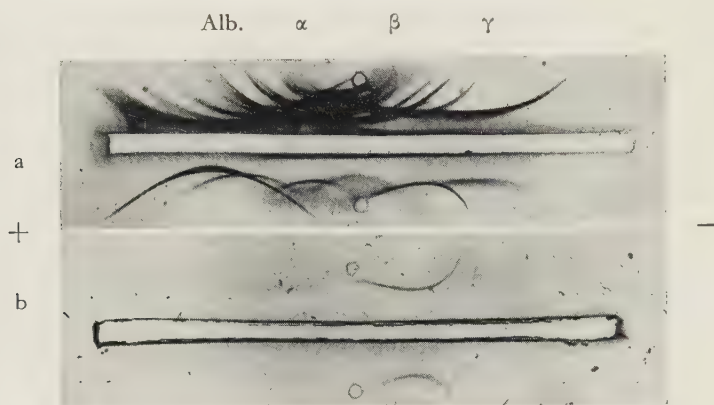


FIG. 8. Analyses immunoélectrophorétiques

en a: du sérum d'un patient atteint de macroglobulinémie, à l'aide du sérum de cheval anti-sérum humain (ch 491).

en b: d'un lysat de plaquettes humaines incubées dans ce sérum pathologique, puis lavées 7 fois à l'aide d'un sérum de lapin anti- β_2 -macroglobuline.

Noter la présence dans le deuxième diagramme du trait caractéristique β_2 M mis en évidence dans le sérum pathologique.

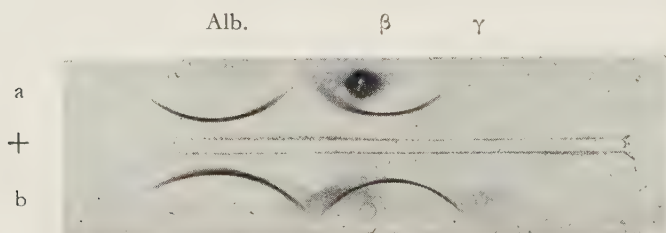


FIG. 9. Analyse immunoélectrophorétique

en a: d'un lysat de plaquettes isolées chez un malade atteint de β -myélome et lavées 7 fois.

en b: du sérum de ce même malade, la précipitation étant réalisée à l'aide du sérum de cheval anti-sérum humain (ch 491).

On retrouve dans le lysat plaquettaire l'anomalie décelée dans le sérum.

La signification de ces phénomènes d'absorption nous échappe encore. Le fibrinogène plaquettaire intervient, comme l'a montré SOKAL (1962), dans les processus de structuration du caillot. Par contre, il ne semble pas participer au premier stade de la métamorphose visqueuse des plaquettes puisque, avec VERSTRAETE et BOUNAMEAUX (1957), nous ne l'avons pas décelé dans les thrombocytes d'un patient atteint

d'afibrinogénémie congénitale dont la métamorphose visqueuse se déroulait cependant, tout au moins en ses débuts, de façon apparemment normale.

Les paraprotéines que nous avons mises en évidence dans les lysats de plaquettes prélevées chez les patients atteints de dysprotéinémie pourraient, selon divers auteurs (JÜRGENS, 1957 ; PACHTER *et al.*, 1959), inhiber la libération du facteur 3 plaquettaire et expliquer ainsi certains des troubles hémorragiques rencontrés chez ces malades.

4) Antigènes spécifiquement plaquettaires.

Le sérum anti-plaquettes humaines, débarrassé des anticorps qu'en précipite le sérum humain, donne, avec le lysat plaquettaire soumis à l'analyse imm.électr., 3 lignes de précipitation, respectivement localisées l'une en α et les deux autres en β . L'une de ces dernières correspond au fibrinogène. En effet, cette précipitation n'a pas lieu si le lysat plaquettaire est traité par la thrombine ou chauffé à 56° pendant 3 minutes, traitements qui altèrent le fibrinogène. Elle n'a pas lieu davantage si le sérum anti-plaquettes, au lieu d'être préalablement traité par du sérum humain, est mis en présence de plasma de même origine, ces deux réactifs différant notamment l'un de l'autre par la présence de fibrinogène dans le second et son absence dans le premier.

La nature des deux autres substances antigéniques nous échappe encore. Celle qui se situe en α renferme un constituant lipidique, car elle se colore par le noir Soudan.

L'utilisation de lysats fortement concentrés par évaporation permet de déceler, en plus des trois antigènes précités, 2 autres lignes de précipitation, toutes situées dans la région des α -globulines.

De nouvelles recherches devront préciser le rôle et la nature chimique de ces substances.

II. Etude des plaquettes de diverses espèces animales.

Cherchant avec BOUNAMEAUX (1958) à préciser la nature du « Clottable factor » de WARE, FAHEY et SEEGER (1948), substance coagulable par la thrombine contenue dans les lysats de plaquettes bovines, nous avons pu montrer, par les méthodes qui viennent d'être décrites pour les plaquettes humaines, que cette substance est le fibrino-

gène et qu'elle constitue un des principaux antigènes plaquettaires. Les plaquettes bovines renferment également les autres antigènes à mobilités α et β décelés dans les plaquettes humaines.

Ayant mis en évidence une parenté antigénique entre les fibrinogènes de bœuf, mouton, cheval, porc (SALMON et BOUNAMEAUX, 1958), nous avons observé que le sérum anti-fibrinogène de bœuf précipite, dans les lysats de plaquettes provenant de toutes les espèces précitées, un antigène ayant les caractères physico-chimiques du fibrinogène : il ne se retrouve pas dans les lysats traités par la thrombine ou chauffés 3 minutes à 56°.

III. Application des recherches antérieures à l'analyse des plaquettes du rat.

1. Matériel.

Pour les recherches visant à la mise en évidence d'antigènes communs aux plaquettes et aux parois vasculaires, nous avons choisi le rat albinos.

Cent vingt rats anesthésiés à l'éther ont été saignés par ponction cardiaque. Ce sang, additionné à un dixième en volume d'une solution de citrate de sodium à 10 %, a été traité de manière à obtenir séparément le plasma et les plaquettes. Celles-ci ont été lavées 7 fois comme dans les études antérieures et utilisées à la concentration de 3×10^6 éléments par mm^3 .

Le fibrinogène a été précipité du plasma sous forme de fraction I de COHN, puis remis en solution à 3 % en liquide physiologique.

Chacune de ces préparations, conservée à l'état congelé, a servi à l'immunisation de 3 lapins. Elles sont additionnées d'un égal volume de gel d'alumine *. Elles ont été injectées par voie intraveineuse selon le schéma d'immunisation décrit antérieurement.

Les immunsérums recueillis 12 jours après la dernière injection sont inactivés par un chauffage de 30 minutes à 56°. Nous utilisons le sérum anti-plaquettes soit brut (API), soit traité par du sérum de rat (API/S), soit encore précipité par du plasma de rat (API/P).

* Préparé en neutralisant une solution d'alun ammoniacal à 2 % par la soude caustique, puis en lavant le précipité 3 fois en liquide physiologique, et en le resuspendant ensuite en liquide physiologique dans le volume du départ.

Le sérum anti-fraction I de COHN est généralement utilisé après précipitation de ses anticorps anti-protéines sériques (AF-I/S).

2. Résultats.

Le sérum anti-plaquettes de rat donne naissance à de nombreuses lignes de précipitation lorsqu'il révèle le diagramme immunoélectrophorétique du plasma de rat (fig. 10). Traité par du sérum de rat, à raison de 1 volume de ce sérum pour 2 d'anti-sérum, il ne précipite plus qu'un seul antigène plasmatique qui correspond au fibrinogène, de même que chez d'autres espèces pour lesquelles nous l'avons démontré antérieurement.

Agissant sur le lysat plaquettaire, l'immunsérum débarrassé des anticorps qu'en précipite le sérum de rat, donne naissance à 4 lignes de précipitation dont une, correspondant au fibrinogène (fig. 11), n'apparaît que lorsque le lysat a été traité par la thrombine. D'autre part, si le sérum anti-plaquettes est traité par du plasma et non du sérum de rat, il ne donne plus à l'analyse imm.électr., que trois lignes de précipitation

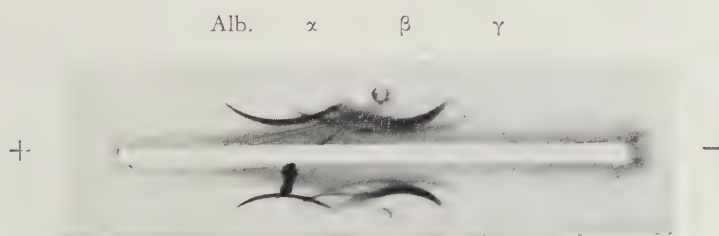


FIG. 10. Analyse immunoélectrophorétique d'un plasma de rat, à l'aide d'un sérum de lapin anti-plaquettes de rat, utilisé brut.



FIG. 11. Analyse immunoélectrophorétique d'un lysat de plaquettes de rat, à l'aide d'un sérum de lapin anti-plaquettes de rat, traité par du sérum de rat.

correspondant à des antigènes plaquettaires ayant des mobilités α_1 , α_2 et β . Comme chez l'homme, l'antigène à mobilité α_2 renferme un constituant lipidique, car sa ligne de précipitation se colore par le noir Soudan.

Le sérum anti-fraction I révèle à l'analyse imm.électr. plusieurs protéines plasmatiques. Débarrassé des anticorps que précipite le sérum de rat (à raison de 0,3 ml pour 1 ml d'immunsérum), il ne donne plus qu'une ligne de précipitation avec le plasma. L'antigène correspondant à cette ligne disparaît sous l'action de la thrombine ou d'un chauffage de 3 minutes à 56°. Il s'agit donc du fibrinogène. L'anti-sérum anti-fibrinogène ainsi obtenu à partir du sérum anti-fraction I donne également une ligne de précipitation en position β avec l'extrait de plaquettes de rat.

La technique d'OUCHTERLONY démontre aisément l'identité de cet antigène plaquettaire et du fibrinogène. En effet, plasma, fraction I de COHN et lysat plaquettaire donnent, sous l'action de l'anti-sérum, des lignes de précipitation qui fusionnent parfaitement (fig. 12).



FIG. 12. Précipitation en gélose :
de plasma (1)
d'une solution de fraction I
de COHN (2)
d'un lysat de plaquettes (3),
ces 3 matériaux étant isolés du
sang du rat, sous l'action d'un
sérum de lapin anti-fibrinogène
de rat (A-FI/S).

Noter la parfaite coalescence de chacune des lignes de précipitation.

Ces expériences prouvent que les plaquettes de rat lavées 7 fois sont toujours porteuses de nombreuses protéines plasmatiques, puisque les immunsérums qu'elles ont suscités chez le lapin sont riches en anticorps dirigés contre ces protéines.

Comme chez l'homme, le fibrinogène est, chez le rat, un des principaux antigènes plaquettaires.

B. RECHERCHE D'UNE PARENTÉ ANTIGÉNIQUE ENTRE PLAQUETTES ET PAROIS VASCULAIRES

Ayant démontré la similitude des structures antigéniques des plaquettes de l'homme et du rat, nous avons choisi ce dernier animal pour notre expérimentation. Notre but était de rechercher la présence éventuelle de matériel plaquettaire au niveau des parois vasculaires à l'aide des techniques immuno-chimiques.

1. Matériel et méthodes.

Les immunsérums utilisés sont les sérums anti-plaquettes et anti-fibrinogène dont la préparation a été décrite plus haut. Nous avons en plus employé du sérum anti-vaisseaux qui a été préparé de la façon suivante : les aortes des 120 rats utilisés pour le prélèvement des plaquettes et du fibrinogène, ont été isolées depuis la crosse jusqu'aux artères rénales. Débarrassées au maximum de leur adventice, elles sont ouvertes sur leur longueur et lavées à 5 reprises en soluté physiologique additionné de 0,1 % d'éthylènediaminetétraacétate disodique. Elles sont ensuite broyées au mortier pendant 15 minutes, après addition de quartz et de soluté physiologique, de façon à obtenir une pâte épaisse. Celle-ci est ensuite délayée dans du NaCl à 0,85 % jusqu'au volume de 100 ml. Le liquide laiteux surnageant est alors récolté, puis soumis à l'action des ondes sonores de haute fréquence, pendant 10 minutes, dans l'appareil RAYTHEON, de façon à solubiliser le maximum d'antigènes. Cet extrait d'aorte additionné d'adjuvants de FREUND à volume égal, est injecté par voie intramusculaire chez 3 lapins, selon le schéma suivant : 2 fois 0,5 ml la 1^{re} semaine, 2 fois 1 ml la 2^e, 2 fois 1,5 ml la 3^e et 2 fois 2 ml la 4^e. Les sérums sont récoltés 12 jours après la dernière injection et inactivés par un chauffage de 30 minutes à 56°.

Cette étude a été réalisée à l'aide de l'analyse imm.électr., de la précipitation en gélose, des épreuves d'agglutination plaquettaire et de l'immunofluorescence (COONS et KAPLAN, 1950). Cette technique immunologique a été effectuée selon les modalités décrites par COCHRANE (1960). Les anticorps de nos anti-sérums, fractionnés par relargage, ont été conjugués à l'isothiocyanate de fluorescéine. Nous avons en plus utilisé du sérum de chèvre anti- γ -globulines de lapin, marqué à la fluorescéine (SYLVANA).

Les prélèvements tissulaires sont réalisés chez le rat endormi à l'éther. Ces pièces, aussitôt congelées à la neige carbonique, sont débitées en coupes de 5 μ d'épaisseur, dans un cryostat. Les préparations sont ensuite légèrement fixées par un bain de 3 minutes dans le méthanol, puis lavées dans une solution aqueuse de NaCl à 0,85 % tamponnée au pH 7. Les coupes sont alors traitées par les anti-sérums marqués à la fluorescéine.

Les préparations sont examinées à l'aide d'un microscope « ZETOPAN BINOLUX REICHERT » soit en contraste de phase en lumière ordinaire, soit en lumière ultra-violette (Lampe à vapeur de mercure OSRAM HBO-200).

2. Résultats.

a) Analyse immunoélectrophorétique et précipitation en gélose.

Le sérum anti-vaisseaux de rat donne de nombreuses lignes de précipitation avec le plasma de rat soumis à l'analyse imm.électr. (fig. 13). Lorsqu'il est débarrassé des anticorps qui précipite le sérum de rat jusqu'à négativation du « ring-test », il ne précipite plus qu'une seule protéine plasmatique qu'on indentifie comme étant le fibrinogène.

Agissant sur l'extrait d'aorte, cet immunsérum, utilisé brut, précipite des traces de substances aux mobilités d'albumine et de γ -globulines. Préalablement traité par du sérum ou du plasma de rat, il ne donne plus aucun précipité avec l'extrait vasculaire.

Ce sérum anti-vaisseaux, utilisé brut, induit la formation de plusieurs traits de précipitation avec le lysat plaquettaire soumis à l'immunoélectrophorèse. Les antigènes précipités ont des mobilités électrophorétiques variées. Lorsque l'anti-sérum a été traité par du sérum de rat, seul un

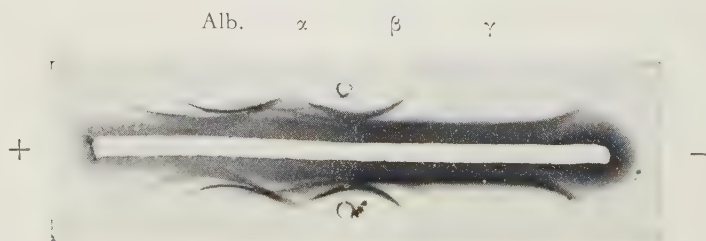


FIG. 13. Analyse immunoélectrophorétique du plasma de rat, à l'aide d'un sérum de lapin anti-vaisseaux de rat, utilisé brut.

trait à mobilité β apparaît. Il s'agit de fibrinogène, ainsi qu'on le démontre aisément par la technique d'OUCHTERLONY en plaçant dans 2 cuvettes adjacentes sérum anti-fibrinogène et sérum anti-aorte épuisé diffusant contre le lysat plaquettaire.

Le sérum anti-plaquettes utilisé brut précipite, en présence d'extrait vasculaire, des traces d'antigènes à mobilité électrophorétique d'albumine et de γ -globulines. Lorsque l'anti-sérum a été traité par du sérum de rat, il est sans action sur cet extrait.

L'extrait vasculaire ne fixe pas les anticorps spécifiquement anti-plaquettes, c'est-à-dire ceux qui persistent dans le sérum anti-plaquettes après précipitation, par du plasma de rat : le diagramme immunoélectrophorétique obtenu en mettant en présence le lysat plaquettaire et le sérum spécifiquement anti-plaquettes est identique, que celui-ci ait été ou non traité par l'extrait vasculaire.

b) Agglutination.

Les techniques de précipitation en gélose, peu sensibles certes, ne nous ayant pas permis de déceler des antigènes spécifiques communs aux plaquettes et aux vaisseaux, nous avons eu recours aux tests d'agglutination plaquettaire.

Comme le montre le tableau III, le sérum anti-plaquettes utilisé brut (API) agglutine celles-ci jusqu'à la dilution 1/2048. Après précipitation par du sérum (API/S) ou du plasma de rat (API/P), il est actif jusqu'à la dilution 1/1024. Traité par un égal volume d'extrait d'aorte, il ne subit aucune diminution de son titre agglutinant.

Le sérum anti-fraction I (AF-I), comme le sérum spécifiquement anti-fibrinogène (AF-I/S), n'agglutine les plaquettes que jusqu'à la dilution 1/64. Quant au sérum anti-vaisseaux (AA), son titre agglutinant pour les plaquettes n'est que de 1/16 et demeure inchangé après précipitation par du sérum de rat (AA/S). Par contre, précipité par du plasma dépourvu de plaquettes (AA/P), il perd son activité agglutinante envers les thrombocytes. Lors de la réalisation de ces épreuves, il est tenu compte de la dilution que provoquent les essais d'épuisement.

Les expériences qui précèdent permettent d'affirmer que les extraits vasculaires utilisés renferment diverses protéines plasmatiques malgré les 5 lavages subis par les vaisseaux. En effet, les anti-sérums auxquels ils ont donné naissance renferment de nombreux anticorps anti-protéines plasmatiques. Cette observation mérite d'être soulignée, car divers

TABLEAU III

Activité agglutinante de divers sérums de lapin envers des plaquettes de rats.

Nature du sérum	Titre agglutinant
Anti-plaquettes brut	1/2048
Anti-plaquettes précipité par du sérum	1/1024
Anti-plaquettes précipité par du plasma sans plaquettes . . .	1/1024
Anti-plaquettes précipité par du plasma, puis par de l'extrait d'aorte	1/1024
Anti-fraction I de COHN	1/64
Anti-fibrinogène	1/64
Anti-aorte brut	1/16
Anti-aorte précipité par du sérum	1/16
Anti-aorte précipité par du plasma	0
Lapin non immunisé	0
Liquide physiologique	0

auteurs ont utilisé de tels sérums avec l'espoir de reproduire expérimentalement le purpura de type vasculaire pur.

Le sérum anti-vaisseaux précipite le fibrinogène, mais le sérum anti-fibrinogène ne précipite pas l'extrait d'aorte, quelle que soit la concentration utilisée. Nous pensons pouvoir expliquer cette apparente contradiction. Certes l'extrait renferme de la fibrine et nous avons montré qu'injectée par voie intramusculaire au lapin, elle est antigénique et donne naissance à des anticorps précipitant le fibrinogène. Mais dans l'extrait d'aorte, la fibrine, qui se trouve sous forme finement dispersée par le broyage et la désintégration dans l'appareil RAYTHEON, est insoluble et, ne pouvant diffuser dans la gélose, n'est pas précipitée par les anticorps anti-fibrinogène.

Cette substance se trouvait-elle sous forme de fibrine ou de fibrinogène dans l'aorte des rats en vie ? Cette question de première importance sera discutée ultérieurement. On sait, en effet, que plusieurs auteurs estiment qu'il existe, à l'intérieur des vaisseaux, un film de fibrine responsable du maintien de la résistance vasculaire normale (COPLEY, 1954 ; LEVENE, 1956 ; ROSS, 1958).

Les expériences d'agglutination plaquettaire, comme celles réalisées en gélose, ne mettent pas en évidence d'antigènes communs aux plaquettes et aux vaisseaux. En effet, le sérum anti-plaquettes spécifique ne subit aucune réduction de son titre agglutinant sous l'effet de l'extrait vasculaire. Le faible pouvoir agglutinant du sérum anti-vasseaux envers les thrombocytes s'explique par son contenu en anticorps anti-protéines plasmatiques, car dépourvu de ces anticorps par traitement avec du plasma de rat, il n'agglutine plus les plaquettes.

c) Immunofluorescence.

Chez 3 rats endormis à l'éther, nous avons prélevé des fragments de rein, de foie et de poumon. Ces pièces, aussitôt congelées, sont débitées en coupes de 5 μ dans un cryostat, puis fixées par un bain de 3 minutes dans du méthanol. Ces coupes ont été incubées en présence de : a) sérum anti-plaquettes traité par du plasma et marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine, b) de même anti-sérum non fluorescent, puis de sérum de chèvre anti- γ -globulines de lapin fluorescent, c) sérum anti-vasseaux traité par du plasma et conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine.

A l'examen des préparations, en lumière ultra-violette, nous n'avons jamais observé de fluorescence au niveau des parois vasculaires, quel que soit le type de traitement subi par les coupes.

Cependant, le sérum anti-plaquettes marqué, mis au contact de plaquettes lavées, montre celles-ci sous la forme d'anneaux fluorescents (fig. 14).

Les techniques utilisant l'immunofluorescence ne nous ont donc pas permis de retrouver du matériel plaquettaire sur l'endothélium vasculaire, ni d'identifier des constituants antigéniques spécifiquement vasculaires.

3. Discussion.

L'étude immunochimique des plaquettes nous a permis d'apporter de nouvelles données en faveur de la théorie selon laquelle ces éléments comprendraient des constituants intrinsèques et d'autres dérivés du plasma. Il avait déjà été démontré que divers facteurs de coagulation, décelés au niveau des plaquettes, étaient d'origine plasmatique (HJÖRT *et al.*, 1955 ; BOUNAMEAUX, 1957). Il en serait de même de la sérotonine

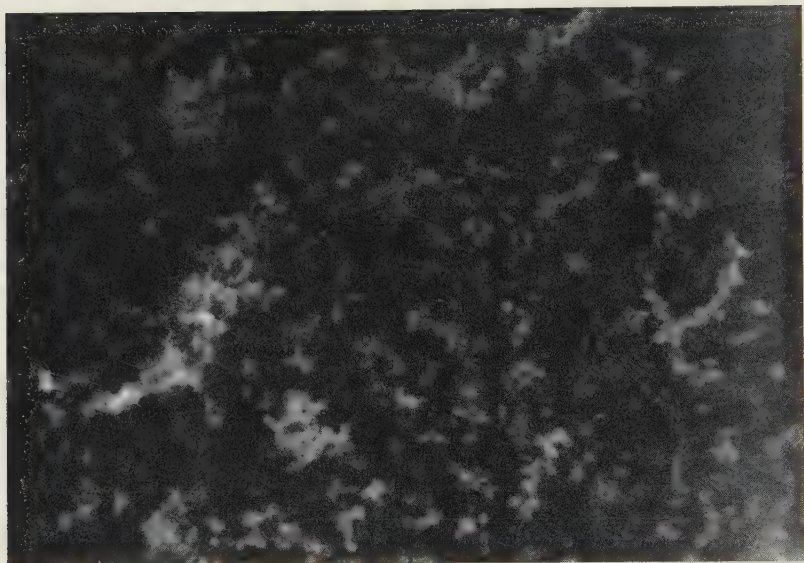


FIG. 14. Examen, en lumière ultra-violette, d'une suspension de plaquettes de rat incubées dans du sérum anti-plaquettes, conjugué à de l'isothiocyanate de fluorescéine.

Noter la fluorescence sous forme d'anneaux.

(BORN *et al.*, 1959), de l'adrénaline (SANO, 1959) et d'autres substances. Les diverses protéines plasmatiques, tant normales que pathologiques, que nous avons décelées dans les lysats plaquettaires sont vraisemblablement absorbées du plasma (ADELSON *et al.*, 1961), comme le montrent les expériences réalisées à l'aide de paraprotéines et de protéines marquées à l'iode radioactif. Le mécanisme responsable de l'absorption de ces protéines est encore inconnu. Le fibrinogène plaquettaire, mis en évidence par les techniques immunochimiques, a pu être isolé et caractérisé chimiquement par LÜSCHER (1959). Il joue vraisemblablement un rôle dans la structuration du caillot en permettant l'orientation des fibres de fibrine (SOKAL, 1962).

La nature et le rôle physiologique des substances antigéniques spécifiquement plaquettaires décelées chez l'homme, le bœuf et le rat, sont encore inconnus. Nous avons établi que divers antigènes plasmatiques, et notamment le fibrinogène, sont fermement fixés aux plaquettes comme aux parois vasculaires. Mais aucune des techniques utilisées : analyse imm.électr., précipitation en gélose, immunofluorescence et

agglutination plaquettaire, ne nous a permis de déceler des antigènes qui seraient simultanément spécifiques aux plaquettes et aux vaisseaux. Nous ne pouvons donc confirmer l'hypothèse d'une similitude antigénique véritable des plaquettes et des parois vasculaires, suggérée par BEDSON (1922), puis par ROSKAM (1934).

Ces constatations ne sont guère en faveur de la théorie de FRANK (1925) selon laquelle les plaquettes, disposées en couche continue sur les **endothélia** vasculaires, interviendraient dans le maintien de la résistance physiologique des vaisseaux, que fragiliserait dès lors toute thrombopénie importante. Cette théorie n'a d'ailleurs pas reçu l'appui des observations morphologiques les plus récentes réalisées au microscope électronique.

4. Conclusions.

1) Les plaquettes renferment des antigènes intrinsèques et d'autres absorbés du plasma.

2) Les immunsérums obtenus après injection de plaquettes lavées, contiennent de nombreux anticorps anti-protéines plasmatiques. Il est indispensable de les éliminer pour obtenir des anti-sérums dirigés contre les antigènes spécifiquement plaquettaires.

3) Les sérums anti-vaisseaux sont également riches en anticorps anti-protéines plasmatiques, qu'il faut aussi éliminer pour obtenir des anti-sérums spécifiques.

4) Il ne paraît pas exister d'antigène intrinsèque qui soit à la fois spécifique aux plaquettes et aux parois vasculaires.

5) On ne peut expliquer l'action toxique des sérums anti-plaquettes envers les vaisseaux par l'identité antigénique des constituants plaquettaires et vasculaires.

CHAPITRE II

ACTION DES SÉRUMS ANTI-PLAQUETTES, ANTI-FIBRINOGENÈ ET ANTI-VAISSEAUX CHEZ LE RAT

LA production expérimentale du purpura thrombopénique à l'aide de sérums anti-plaquettes est réalisée depuis de nombreuses années. Néanmoins, le mécanisme des altérations vasculaires demeure toujours inconnu. Dans le but de reproduire la lésion vasculaire pure, divers auteurs ont tenté d'induire celle-ci sans thrombopénie associée. Certains ont utilisé des sérums anti-vasseaux, pensant ainsi léser spécifiquement l'endothélium vasculaire (CLARK *et al.*, 1950 ; ISRAËL *et al.*, 1956 ; PIOMELLI *et al.*, 1962). D'autres ont eu recours à des sérums anti-fibrine, postulant qu'il existe une couche de fibrine sur la paroi endothéliale (COPLEY *et al.*, 1956).

Il nous a paru utile de comparer ces divers types de purpura d'origine immunologique. Cette étude a été réalisée chez le rat, espèce pour laquelle nous possédions des sérums anti-plaquettes, anti-vasseaux et anti-fibrinogène spécifiques. Contrairement aux autres auteurs, nous connaissions, grâce à l'analyse imm.électr., la polyvalence de nos anti-sérums, et nous avons pu en dériver des immunsérums spécifiques pour chaque antigène étudié, grâce à l'élimination des anticorps indésirables par réaction avec un matériel antigénique approprié.

A. SÉRUM ANTI-PLAQUETTES

1. Matériel et méthodes.

L'immunsérum utilisé dans ces essais et dont la préparation a été décrite antérieurement (chapitre 2, page 62), est utilisé brut (API) ou débarrassé des anticorps qui précipitent après addition soit de sérum

(APL/S), soit de plasma (APL/P) de rat à raison de 0,3 ml pour 1 ml d'anti-sérum.

Le contrôle immunoélectrophorétique de ces anti-sérums a montré que APL renferme des anticorps anti-protéines plasmatiques variés, et d'autres spécifiquement anti-plaquettaires ; APL/S contient ces anticorps anti-plaquettes et des anticorps anti-fibrinogène ; APL/P ne renferme que les anticorps anti-plaquettes.

La quantité d'anti-sérum brut APL injectée est de 0,5 ml. Celle qui y correspond pour les anti-sérums APL/S ou APL/P, dilués à la suite de leur traitement par le sérum ou le plasma, est de 0,65 ml. De plus fortes doses sont très mal tolérées, souvent suivies d'un choc précoce et de mort rapide.

L'injection est réalisée dans une veine de la queue ou par voie sous-cutanée dans la paroi abdominale, chez des groupes de 10 rats pesant environ 150 g.

Six à 24 heures après l'administration d'anti-sérum, du sang citraté est prélevé par ponction cardiaque à thorax ouvert, pour y dénombrer les plaquettes, selon la technique décrite par BOUNAMEAUX (1958). Chaque rat est soumis à une autopsie minutieuse.

Le nombre, l'étendue et la localisation des lésions hémorragiques macroscopiques sont soigneusement notés. Des prélèvements biopsiques sont faits au niveau des lésions provoquées par l'injection sous-cutanée de l'anti-sérum. Ils sont fixés au liquide de BOUIN et enchâssés à la paraffine. Les coupes histologiques, épaisses de 4 à 5 μ , sont colorées à l'hématoxyline-éosine.

2. Résultats.

a) EFFET DU SÉRUM ANTI-PLAQUETTES ADMINISTRÉ PAR VOIE INTRA-VEINEUSE.

1) **Thrombopénie.** — Après injection intra-veineuse, les sérums anti-plaquettes, que ce soit APL, APL/S ou APL/P, provoquent qualitativement et quantitativement les mêmes effets : une intense thrombopénie (le taux des plaquettes tombant généralement en dessous de 10.000 éléments par mm^3) décelée dès la 6^e heure et persistant encore à la 24^e.

Il existe toutefois d'importantes variations individuelles de la thrombopénie qui dépendent, vraisemblablement, en partie, des aléas de

l'injection intra-veineuse (Tableau IV). Elles sont plus importantes à la 6^e heure qu'à la 24^e.

TABLEAU IV

Sérum anti-plaquettes brut (API)				Sérum anti-plaquettes traité par du plasma (API/P)			
Plaquettes par mm ³	Effet hémorragique			Plaquettes par mm ³	Effet hémorragique		
	queue	viscères	mésentère		queue	viscères	mésentère
3.600	+++	+++	+++	1.650	++	+++	++
4.000	++++	++++	+	2.200	++	++	+++
5.800	0	+	+	3.300	+	+	+
6.900	0	+++	++	5.800	0	+++	+++
7.150	0	+	0	8.000	+	++	+++
8.250	0	++	++	8.800	0	++	++
8.500	++++	+++	+++	19.450	0	+	++
23.000	++++	++	++	51.700	0	0	+
82.500	+	+	0	203.500	0	0	+
209.000	0	+++	++	233.200	0	+	+

Taux des plaquettes et intensité des lésions hémorragiques chez les rats dont le mésentère a été examiné *in vivo* au microscope, puis qui ont été sacrifiés et autopsiés après **injection intra-veineuse** de sérum anti-plaquettes brut (API) ou de cet anti-sérum dont les anticorps anti-protéines plasmatiques ont été précipités par du plasma de rat (API/P).

2) Hémorragies. — L'effet hémorragique des anti-sérums API, API/S et API/P est manifeste dès la 6^e heure, mais plus intense à la 24^e. Les suffusions sanguines se rencontrent surtout sur la queue, les pattes et dans le tractus digestif, particulièrement au niveau des régions qui sont en contact avec des excréments solides. Ces lésions se présentent, au début, sous l'aspect de taches purpuriques, planes et punctiformes, particulièrement sur l'intestin et la face interne de la peau où elles sont aisément observées. Par après, elles prennent un aspect ecchymotique, notamment sur le caecum et la queue.

L'effet purpurigène du sérum API paraît être légèrement supérieur à celui des anti-sérums API/S et API/P. Toutefois, il est malaisé de mesurer et d'exprimer par un chiffre l'intensité d'une réaction purpurique. La valeur de cette constatation est donc limitée par son caractère subjectif.

L'observation microscopique *in vivo* de la membrane mésentérique du rat injecté de sérum anti-plaquettes a été faite chez le rat anesthésié au nembutal, selon la technique de CHAMBERS et ZWEIFACH (1944), modifiée par HUGUES (1953).

Chez 6 rats non traités, l'observation prolongée pendant 30 minutes n'a permis de déceler aucune rupture vasculaire ni de constater la sortie d'hématies du système vasculaire. Par contre, chez les animaux injectés de sérum anti-plaquettes, l'examen du mésentère révèle la présence de pétéchies invisibles à l'œil nu. Celles-ci sont, le plus souvent, périveineuses. Leur éclosion, qui survient parfois sous l'œil de l'observateur, semble faire suite à une rupture vasculaire, suivie d'une extravasation sanguine (fig. 15). Nous n'avons jamais observé, à l'intérieur des vaisseaux, des manchons leucocyto-plaquettaires provoquant des ralentisse-

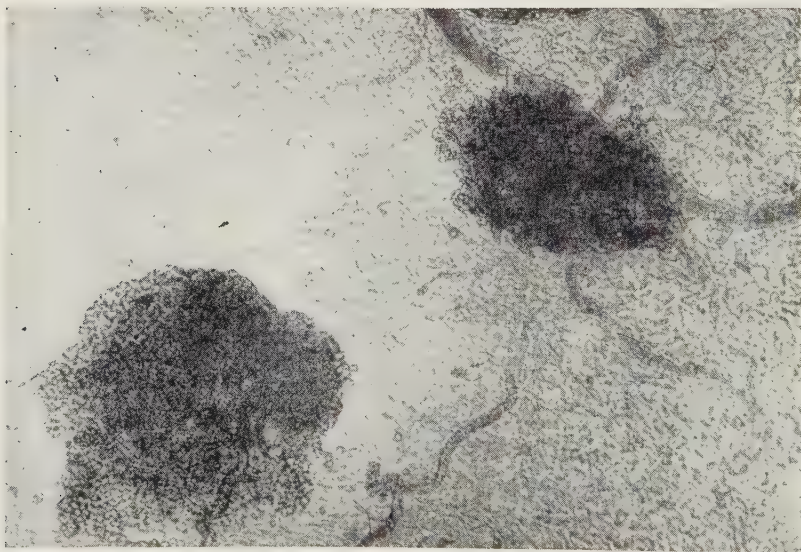


FIG. 15. Lésions purpuriques telles qu'elles apparaissent, *in vivo*, à l'examen microscopique du mésentère d'un rat injecté 6 heures plus tôt de sérum anti-plaquettes par voie intra-veineuse.

ments circulatoires, comme l'ont décrit LECOMTE et HUGUES (1956) dans leur étude des réactions anaphylactiques des vaisseaux mésentériques du lapin.

La fragilité des vaisseaux microscopiques après injection de sérum anti-plaquettes est d'ailleurs évidente, car la moindre manipulation du mésentère provoque des lésions vasculaires, suivies de saignements très prolongés, phénomène qui ne s'observe pas chez les animaux témoins.

L'intervention d'un facteur traumatique agissant sur des vaisseaux fragilisés trouve confirmation dans la localisation des lésions : la queue, les pattes, l'intestin, régions d'élection comme nous l'avons vu, qui sont en effet soumises à de nombreux traumatismes.

Afin de confirmer le rôle du facteur traumatique, 10 rats ont été fixés sur une planche après administration de l'anti-sérum. Leur queue est protégée de toute contusion, par un tube de verre. Dix autres sont abandonnés dans leur cage, après l'injection. Six heures plus tard, tous les animaux sont tués. Le dénombrement de leurs plaquettes montre une thrombopénie semblable dans les deux groupes. L'examen anatomique permet de constater que les lésions cutanées sont beaucoup plus rares chez les rats immobilisés que chez ceux qui ont pu se déplacer dans leur cage. Le purpura intestinal apparaît, par contre, avec la même intensité dans les deux groupes d'animaux.

Il est bien connu que, s'il existe chez l'homme une relation entre la thrombocytose et la tendance aux saignements, celle-ci n'est cependant pas constante. Notre expérimentation chez l'animal confirme ce fait. Ainsi, l'examen du tableau IV montre que si l'effet hémorragique se manifeste essentiellement lorsque le taux des plaquettes devient inférieur à $10.000/\text{mm}^3$, on peut néanmoins observer de nombreuses pétéchies chez un rat possédant 209.000 thrombocytes/ mm^3 , et la rareté de ces lésions chez certains animaux ayant moins de 10.000 plaquettes/ mm^3 .

Il n'existe donc, pas plus chez le rat que chez l'homme, de corrélation stricte entre le taux des plaquettes circulantes et l'importance des hémorragies dites « spontanées ».

b) ACTION DU SÉRUM ANTI-PLAQUETTES, INJECTÉ PAR VOIE SOUS-CUTANÉE.

1) Thrombopénie. — L'effet thrombopéniant des sérums anti-plaquettes ne se manifeste que 24 heures après l'injection de l'anti-sérum sous la peau du ventre.

A ce moment, qu'il s'agisse des sérums API, API/S ou API/P le taux des plaquettes se trouve aussi bas que 24 heures après l'administration du sérum par voie intra-veineuse. Il convient à nouveau de noter que l'effet thrombopéniant varie beaucoup d'un animal à l'autre (Tableau V).

TABLEAU V

Sérum anti-plaquettes brut (API)				Sérum anti-plaquettes traité par du plasma (API/P)			
Plaquettes par mm ³	Effet hémorragique			Plaquettes par mm ³	Effet hémorragique		
	local	queue	viscères		local	queue	viscères
500	++	+	++	1.000	++++	+++	+++
1.000	++	+	++	1.100	++++	+++	+++
1.000	++	+	++	1.650	+++	+++	+++
2.250	++	+	±	2.125	+++	—	+++
2.700	++	+	++	4.400	+++	+++	+++
4.840	++	+	—	5.830	+	—	++
13.200	++	+	+	8.800	+++	—	++
15.400	++	—	—	99.220	+++	—	—
78.700	++	—	+	110.000	++	—	—
92.000	—	—	+	127.000	++	+	++

Taux des plaquettes et intensité des lésions hémorragiques chez des rats autopsiés 24 heures après **injection sous-cutanée** de sérum anti-plaquettes brut (API) ou de cet anti-sérum dont les anticorps anti-protéines plasmatiques ont été précipités par du plasma de rat (API/P).

2) Hémorragies. — L'administration sous-cutanée de sérum anti-plaquettes produit des lésions hémorragiques à l'endroit de l'injection et des pétéchies disséminées. Ces deux types d'altérations paraissent avoir une pathogénie différente.

La lésion locale apparaît macroscopiquement dès la 8^e heure, en l'absence de toute thrombopénie marquée. Elle se présente sous la forme d'une légère tuméfaction qui, incisée, se montre parsemée d'un fin

semis pétéchial. L'examen histologique montre un exsudat séreux et une infiltration leucocytaire autour de vaisseaux modérément dilatés (fig. 16).

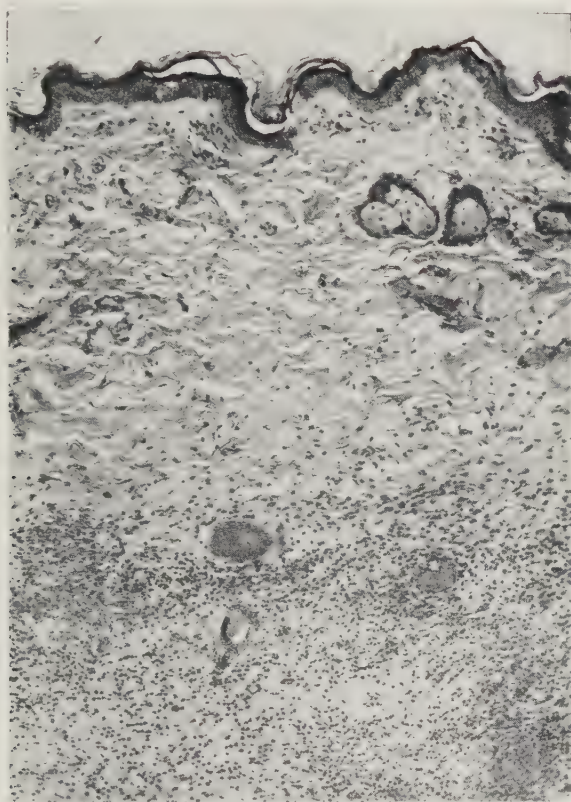


FIG. 16. Aspect histologique de la lésion locale induite, chez le rat, par l'injection sous-cutanée 8 heures plus tôt, de sérum anti-plaquettes. (gross. 100 fois).
Noter l'infiltration cellulaire autour de vaisseaux modérément dilatés.
(Microphotographie du Service d'Anatomie Pathologique, Prof. H.-E. BETZ).

A la 24^e heure, on constate une aggravation manifeste et constante de la lésion locale qui devient largement ecchymotique avec infiltration des plans musculaires profonds. Cette aggravation coïncide avec la période durant laquelle le taux des thrombocytes est le plus bas.

A l'examen histologique (fig. 17 et 18), les capillaires, extrêmement dilatés et gorgés de sang, montrent des plages de nécrose de leur endothélium. Ces lésions s'accompagnent de dégénérescence fibrinoïde interstitielle, de foyers d'exsudation séro-hémorragique et d'infiltration à polynucléaires.

A ce moment, on trouve un important purpura disséminé dans l'ensemble de l'organisme. Les lésions pétéchiiales présentent les mêmes caractères et les mêmes localisations que celles observées après injection intra-veineuse. Elles semblent à nouveau dépendre, le plus souvent,

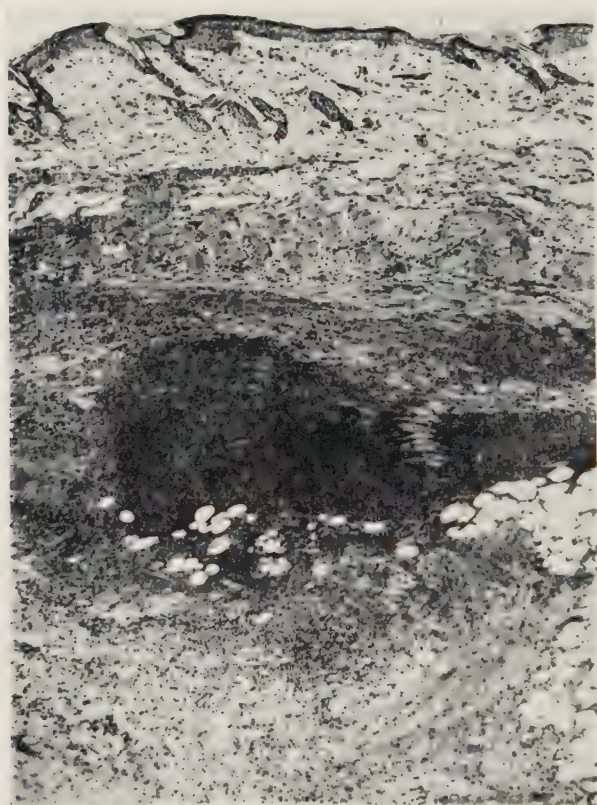


FIG. 17. Aspect histologique de la lésion locale induite, chez le rat, par l'injection sous-cutanée, 24 heures plus tôt, de sérum anti-plaquettes (gross. 60 fois). Noter l'importante infiltration hémorragique. (Microphotographie du Service d'Anatomie Pathologique, Prof. H.-E. BETZ).



FIG. 18. Matériel identique à celui de la figure 17, mais examiné à un plus fort grossissement (gross. 200 fois).

Noter la présence d'un vaisseau dilaté entouré d'une importante infiltration hémorragique.

(Microphotographie du Service d'Anatomie Pathologique, Prof. H.-E. BETZ).

d'un facteur traumatique. Leur nombre et leur intensité sont généralement, mais non toujours, fonction de la thrombopénie.

A la 48^e heure, la lésion locale persiste inchangée. On note cependant une régression de l'éruption purpurique généralisée.

S'il est encore malaisé d'apprécier l'intensité des réactions hémorragiques, il importe de noter que les altérations vasculaires microscopiques, au niveau de la lésion locale, semblent être moins sévères après injection des sérums API/S ou API/P, que du sérum API.

Les lésions vasculaires survenant à l'endroit d'injection du sérum anti-plaquettes semblent avoir une pathogénie différente de celles que provoque l'injection intra-veineuse de l'anti-sérum. Lors de l'observation du mésentère au microscope, nous avons constaté que la lésion pétéchiale était la conséquence d'une simple effraction vasculaire. Par contre, les suffusions hémorragiques survenant là où est injecté l'anti-sérum par voie sous-cutanée, sont précédées d'une infiltration leucocytaire. Ce processus rappelle l'évolution du phénomène d'ARTHUS, la composante hémorragique étant particulièrement intense, sans doute en raison de la thrombopénie.

Il faut remarquer que les effets hémorragiques du sérum anti-plaquettes brut (API) ou privé de ses anticorps anti-protéines plasmatiques, et en particulier anti-fibrinogène (API/P), sont semblables. On ne peut donc attribuer un rôle primordial à ces anticorps anti-fibrinogène dans la production des lésions hémorragiques par le sérum anti-plaquettes. L'étude de l'effet des autres anti-sérums va d'ailleurs étayer cette opinion.

B. SÉRUM ANTI-FIBRINOGENÈ

COPLEY *et al.* (1956) prétendent que le sérum anti-fibrine possède, chez le cobaye, un pouvoir « capillorragique ». Ils expliquent cette action par un effet direct sur la fibrine qui tapisserait l'endothélium vasculaire. Or, étudiant la structure antigénique du fibrinogène et de la fibrine (chapitre I, page 149), nous n'avons pu mettre en évidence de différence entre les déterminants antigéniques de ces deux substances. Nous avons donc recherché l'action purpurigène du sérum anti-fibrinogène chez le rat, après introduction par voie générale (intra-veineuse) ou par voie sous-cutanée.

Nous avons utilisé dans ce but un sérum anti-fraction I de rat (AF-I), dont la préparation a été décrite antérieurement, sérum rendu spécifique du fibrinogène par élimination des anticorps qu'entraîne le sérum de rat (AF-I/S) (chapitre I, page 63).

Injecté dans une veine de la queue à la dose de 1 ml, AF-I/S est très mal toléré par l'animal qui meurt en état de choc. Nous l'avons administré à raison de 0,65 ml à 10 rats qui ont été sacrifiés et autopsiés 24 heures plus tard. Le taux de fibrinogène et la thrombocytose ont été mesurés à ce moment.

a) Comme le montre le tableau VI, l'injection **intra-veineuse** de sérum anti-fibrinogène provoque une thrombopénie importante, mais n'atteignant pas des valeurs aussi basses qu'après injection de sérum anti-plaquettes. Quant au fibrinogène, son taux ne semble guère varier sous l'effet de l'anti-sérum. Enfin, ni l'autopsie minutieuse, ni l'examen microscopique de la membrane mésentérique n'ont jamais révélé de purpura.

TABLEAU VI

Rats	Plaquettes	Fibrinogène (g/litre)
n° 1	262.000	4
2	207.000	4,6
3	294.000	3,3
4	290.000	4,5
5	198.000	5
6	108.000	3,6
7	59.000	4,2
8	141.000	3,8
9	75.000	3
10	110.000	3,5

Taux des plaquettes et du fibrinogène plasmatique mesuré chez 10 rats, 24 heures après l'injection intra-veineuse de 0,65 ml de sérum anti-fibrinogène (AF-I/S). Le taux moyen des plaquettes mesuré chez 10 rats normaux de notre élevage est de 480.000 ± 24.000 éléments par mm^3 . La valeur moyenne du fibrinogène plasmatique est de $3,26 \pm 0,46$ g/litre.

b) L'injection **sous-cutanée** de sérum anti-fibrinogène chez 10 rats n'a provoqué ni thrombopénie ni hypofibrinogénémie. Toutefois, la région injectée est légèrement tuméfiée et présente, après 24 heures, un léger semis purpurique. Aucune autre lésion hémorragique n'a pu être décelée à distance.

L'examen histologique de la lésion locale révèle un peu de vasodilatation, un léger œdème et une infiltration leucocytaire assez intense. Cette image histologique, déjà présente à la 6^e heure (fig. 19) suivant l'injection, ne se modifie guère à la 24^e heure (fig. 20), contrairement

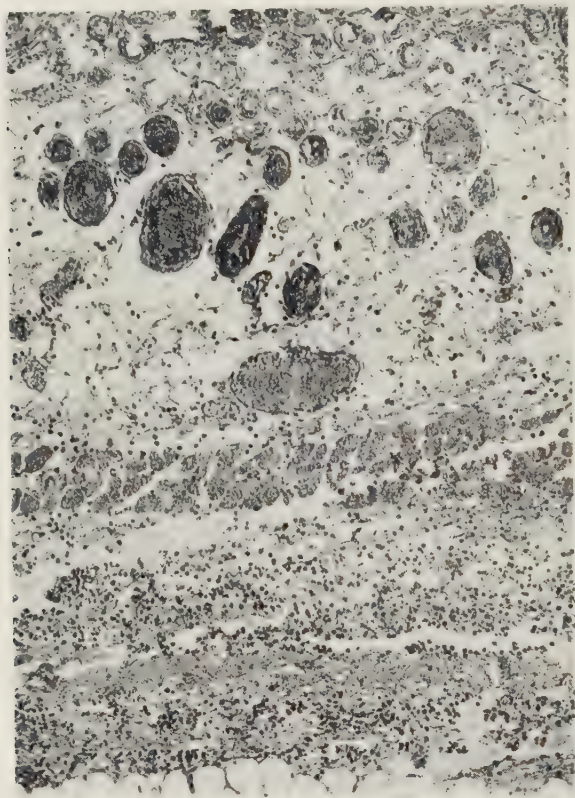


FIG. 19. Aspect histologique de la lésion locale provoquée, chez le rat, par l'injection sous-cutanée, 8 heures plus tôt, de sérum anti-fibrinogène de rat. (gross. 100 fois).

Noter l'importante infiltration cellulaire et la présence d'un vaisseau dilaté. (Microphotographie du Service d'Anatomie Pathologique, Prof. H.-E. BETZ).

à ce qu'on observe après administration de sérum anti-plaquettes. On se rappellera en effet que, dans ce cas, la lésion devient, à ce moment, intensément hémorragique.

En conclusion, il ne nous a pas été possible d'induire du purpura de type vasculaire pur à l'aide de sérum anti-fibrinogène. Quant aux lésions observées par COPLE *et al.* (1956), après injection locale de sérum anti-fibrine, lésions qu'ils attribuent à un effet spécifiquement anti-fibrine, elles peuvent être interprétées également comme l'expression d'un phénomène d'ARTHUS inversé.



FIG. 20. Aspect histologique de la lésion locale provoquée, chez le rat, par l'injection sous-cutanée, 24 heures plus tôt, de sérum anti-fibrinogène de rat. (Gross. 60 fois).

Noter la persistance de l'infiltration cellulaire, mais l'absence de la composante hémorragique observée après injection de sérum anti-plaquettes.

(Microphotographie du Service d'Anatomie Pathologique, Prof. H.-E. BETZ).

C. SÉRUM ANTI-VAISSEAUX

CLARK et JACOBS (1950) ont réussi à induire des lésions hémorragiques chez le chien, après injection d'un sérum de lapin anti-endothélium. ISRAËL *et al.* (1956) ainsi que des auteurs japonais (KATSURA, OHKUBA et HIRAMATSU, cités par CLARK et JACOBS 1950) auraient

pu produire, chez le cobaye, un purpura de type vasculaire pur, aigu, à l'aide de sérum anti-vaisseaux.

Nous avons essayé de reproduire un tel syndrome. Pour ces essais, nous avons utilisé un sérum anti-aorte de rat (AA) dont la préparation a été décrite plus haut, après en avoir éliminé les anticorps anti-protéines plasmatiques par addition de plasma de rat (AA/P) (chapitre 1, page 65).

a) Injecté par voie **intra-veineuse** à la dose de 1 ml, AA/P est mal toléré par le rat qui présente les symptômes d'un choc anaphylactique : dyspnée, faiblesse intense et, éventuellement, mort. A l'autopsie de ces animaux, on note une importante dilatation du cœur droit et une stase veineuse marquée au niveau du tube digestif. Nous avons donc administré 0,65 ml de l'anti-sérum AA/P à 10 rats pesant environ 150 g, qui ont été sacrifiés 24 heures plus tard.

Les examens anatomiques minutieux n'ont révélé aucune lésion hémorragique. Le taux des plaquettes dénombrées sur un échantillon de sang du cœur, est diminué, mais reste cependant au-dessus de 100.000 par mm³ (Tableau VII).

b) Lorsque l'anti-sérum est injecté par voie **sous-cutanée** (10 rats) dans la peau de l'abdomen préalablement rasée, on voit survenir, vers la 6^e heure, une faible réaction œdémateuse qui devient très légèrement

TABLEAU VII

Rats	Plaquettes
n° 1	142.000
2	232.000
3	254.000
4	125.000
5	212.000
6	385.000
7	295.000
8	330.000
9	198.000
10	352.000

Taux des plaquettes mesuré chez 10 rats, 24 heures après l'injection intra-veineuse de sérum anti-vaisseaux.

hémorragique à la 24^e heure. L'étude histologique de la lésion montre un peu d'œdème, une infiltration à polynucléaires et quelques hémorragies diffuses. La thrombocytose ne subit aucune réduction importante.

Jamais nous n'avons observé de réactions hémorragiques semblables à celles décrites par CLARK et JACOBS (1950).

En conclusion, il ne nous a pas été possible de produire expérimentalement, chez le rat, par injection de sérum anti-vasseaux, un purpura de type « anaphylactoïde », contrairement à ce que d'autres auteurs ont obtenu chez d'autres espèces animales.

Signalons cependant que, récemment, PIOMELLI *et al.* (1962) ont également échoué en essayant d'induire un purpura purement vasculaire chez le lapin, le cobaye et le chien.

La comparaison des résultats rapportés par des auteurs différents est malaisée étant donné qu'il est difficile d'obtenir de bons extraits d'endothélium. D'autre part, la réponse des animaux à l'immunisation est extrêmement variable.

Les extraits vasculaires que nous avons utilisés, comme ceux des autres auteurs, renferment certes de nombreux constituants étrangers à l'endothélium. Nous avons montré qu'ils contiennent notamment diverses protéines plasmatiques et tout spécialement du fibrinogène ou de la fibrine. Ces substances qui ont suscité la formation d'anticorps chez le lapin, doivent vraisemblablement contaminer aussi les préparations utilisées par les autres chercheurs. L'emploi d'anti-sérums renfermant des anticorps aussi nombreux et variés explique les contradictions relevées dans la littérature consacrée au purpura vasculaire pur d'origine immunologique. Une étude valable de ce syndrome expérimental ne pourra être effectuée que lorsqu'on disposera d'un sérum rigoureusement spécifique des antigènes propres aux vaisseaux.

Les lésions locales que nous avons pu observer n'ont rien de caractéristiques et semblent pouvoir s'expliquer, comme le pensent aussi PIOMELLI *et al.* (1962), par un phénomène d'anaphylaxie locale. Elles ressemblent d'ailleurs à celles qu'induit le sérum anti-fibrinogène chez le rat.

Rappelons que les nombreux travaux tendant à mettre en évidence des auto-anticorps dirigés contre l'endothélium des vaisseaux dans les purpuras humains de type vasculaire, n'ont pas abouti jusqu'à présent (MIESCHER *et al.*, 1957). Il est d'ailleurs plus vraisemblable que le purpura de type SCHÖNLEIN-HENOCH soit secondaire à une réaction allergique, dirigée contre des antigènes variés : bactériens, alimentaires,

médicamenteux, la lésion vasculaire étant consécutive à la réaction antigène-anticorps. Le rôle des processus d'auto-immunisation dans la pathogénie du purpura rhumatoïde n'est donc certes pas établie.

DISCUSSION

S'il est possible d'induire des lésions purpuriques généralisées chez le rat à l'aide d'un sérum anti-plaquettes, nous n'avons pu reproduire semblable phénomène ni au moyen de sérum anti-fibrinogène ni avec un sérum anti-vaisseaux.

Il nous a donc été impossible de provoquer un purpura de type vasculaire pur, puisque thrombopénie et lésion de la paroi vasculaire n'ont pu être dissociées.

La lésion vasculaire du purpura thrombopénique immunologique paraît bien être liée à la thrombopénie qu'induit le sérum anti-plaquettes spécifique. Ce dernier provoque une fragilisation vasculaire généralisée. Cette action ne peut être attribuée à l'effet des anticorps anti-fibrinogène présents dans le sérum anti-plaquettes brut, puisque cet anti-sérum traité par du plasma de rat conserve son effet purpurigène et que, d'autre part, le sérum anti-fibrinogène injecté par voie intra-veineuse ne provoque pas de purpura. On ne peut non plus expliquer les altérations vasculaires par l'existence d'antigènes spécifiques communs aux plaquettes et aux vaisseaux (voir chapitre 1).

Il faut d'ailleurs signaler que notre sérum anti-vaisseaux est dépourvu d'effet purpurigène généralisé.

Selon CLARK et JACOBS (1950), KATSURA, OHKUBA et HIRAMATSU auraient obtenu un sérum anti-endothélium de cobaye chez le lapin. Ce sérum, qui agglutine les plaquettes, les leucocytes et les hématies, induirait, par voie intra-veineuse, un important purpura généralisé, sans thrombopénie associée. On ne manquera pas d'être surpris par semblable résultat. Il est en effet bien connu que toute réaction antigène-anticorps se déroulant dans le torrent circulatoire provoque une thrombopénie (ACHARD et AYNAUD, 1909). Nous avons d'ailleurs constaté dans le présent travail que le sérum anti-fibrinogène et même le sérum anti-vaisseaux, après élimination de ses anticorps anti-protéines plasmatiques, induisent une chute importante du taux des plaquettes. D'ailleurs, un sérum hétérologue injecté par voie intra-veineuse provoque

régulièrement une certaine thrombopénie. Il est donc très malaisé d'interpréter les résultats expérimentaux des auteurs japonais.

L'action purpurigène de faible intensité observée chez le rat après injection sous-cutanée de sérum anti-fibrinogène et de sérum anti-vasseaux s'explique vraisemblablement par un phénomène d'anaphylaxie locale, pareil au phénomène d'ARTHUS. La lésion que provoque l'injection sous-cutanée de sérum anti-plaquettes est semblable, dans les premières heures, à celle qu'induisent les sérums anti-fibrinogène et anti-vasseaux. Nous l'interprétons également comme la conséquence d'une réaction antigène-anticorps locale. Les faibles suffusions hémorragiques apparues dans les premières heures sont considérablement aggravées lorsque le sérum anti-plaquettes, résorbé dans la circulation, a provoqué une intense thrombopénie. C'est à ce moment qu'apparaissent les lésions purpuriques à distance.

Si l'étude comparée de l'action des sérums anti-plaquettes, anti-fibrinogène et anti-vasseaux injectés par voie sous-cutanée jette quelque lumière sur le mécanisme de la lésion hémorragique locale provoquée par le sérum anti-plaquettes, elle n'élucide en rien la pathogénie des lésions pétéchiales.

CONCLUSIONS

1) L'injection intra-veineuse ou sous-cutanée de sérum anti-plaquettes provoque, chez le rat, un important purpura généralisé.

2) L'administration sous-cutanée de sérum anti-plaquettes induit, en plus, la formation d'une large lésion hémorragique à l'endroit injecté. Celle-ci est semblable à celle qu'engendre une banale réaction antigène-anticorps se déroulant dans les tissus, mais que complique l'importante thrombopénie provoquée par la résorption des anticorps anti-plaquettes.

3) Il ne nous a pas été possible d'induire du purpura généralisé sans thrombopénie, ni au moyen de sérum anti-fibrinogène ni à l'aide de sérum anti-vasseaux. Ces deux immunsérums peuvent néanmoins provoquer une légère réaction hémorragique à l'endroit injecté : celle-ci semble correspondre à un phénomène d'ARTHUS.

CHAPITRE III

CINÉTIQUE DU PURPURA THROMBOPÉNIQUE IMMUNOLOGIQUE

ROLE ÉVENTUEL DES ENZYMES PROTÉOLYTIQUES DANS LA GENÈSE DES ALTÉRATIONS VASCULAIRES

LES recherches exposées dans le chapitre précédent montrent que le sérum anti-plaquettes injecté chez le rat, fragilise les parois vasculaires tout en induisant une importante thrombopénie.

Afin de jeter quelque lumière sur la pathogénie des lésions vasculaires, il nous a paru utile de préciser la cinétique de la thrombopénie induite par l'injection intra-veineuse du sérum anti-plaquettes, en appréciant parallèlement l'intensité des lésions hémorragiques apparaissant sur les téguments et les viscères du rat.

1. Matériel et méthodes.

Le sérum anti-plaquettes (APl) (chapitre 1, page 62), privé de ses anticorps anti-protéines plasmatiques par traitement au plasma de rat (APl/P), est injecté à des rats d'environ 150 g, dans une veine de la queue, à la dose de 0,65 ml, quantité correspondant à 0,5 ml d'anti-sérum brut (APl).

Les animaux, par groupe de 10, sont tués à des moments variés après l'injection : après 15 et 30 minutes, 1, 2, 3, 6, 24 et 48 heures. Dix rats normaux sont utilisés comme témoins et sacrifiés au temps 0.

Le dénombrement des plaquettes est réalisé sur un échantillon de sang citraté prélevé au cœur. Chaque rat est ensuite soumis à une autopsie minutieuse, le nombre, l'étendue et la localisation des lésions hémorragiques étant soigneusement notés. Cet examen est précédé d'une

observation attentive de la membrane mésentérique *in vivo*. Il nous a été malheureusement impossible de suivre l'évolution de la thrombocytose chez chaque rat injecté de sérum anti-plaquettes, car si les prises de sang sont possibles dans les veines de la queue ou dans le sinus rétro-orbitaire, il est très malaisé d'en obtenir un volume fixe et de respecter ainsi les proportions entre sang et anticoagulant. Quelques prises de sang ont été tentées à la seringue chez un même rat, mais nous avons dû abandonner cette technique à cause de l'inconstance des résultats.

S'il est aisé d'obtenir une estimation exacte de la thrombocytose, l'intensité du phénomène hémorragique est, par contre, malaisément mesurée. Nous l'avons évaluée, de façon arbitraire, par les chiffres de 0 à 10. Cette appréciation tout à fait subjective ne prétend à aucune rigueur mathématique, son seul but étant de jeter quelque lumière sur les rapports entre la thrombopénie et la tendance hémorragique.

2. Résultats.

A l'examen de la figure 21, on constate que l'injection intra-veineuse de sérum anti-plaquettes (API/P) provoque une thrombopénie intense, s'installant rapidement. De plus de 400.000, les plaquettes tombent à 60.000/mm³ en 15 minutes. La thrombopénie est la plus marquée dès la 6^e heure. A ce moment, les plaquettes ont presque totalement disparu du torrent circulatoire. Elles réapparaissent progressivement dans les heures et les jours suivants.

Quant aux lésions hémorragiques, elles demeurent très discrètes au cours des 60 premières minutes. Quelques rares pétéchies microscopiques sont découvertes chez certains rats, à l'examen du mésentère. A la 3^e heure, les lésions hémorragiques deviennent plus nombreuses, particulièrement sur le tube digestif où l'on constate en plus une intense congestion veineuse. Le maximum de l'effet hémorragique est atteint après 24 heures. A ce moment, les pétéchies sont abondantes sur la peau et le tube digestif. Chez plusieurs animaux, l'intestin est encombré de selles mélaniques.

A la 48^e heure, alors que la thrombocytose demeure basse, l'éruption pétéchiale diminue d'intensité. Elle régresse encore les jours suivants, bien que le taux des plaquettes n'atteigne, à ce moment, que 50.000 éléments/mm³ environ.

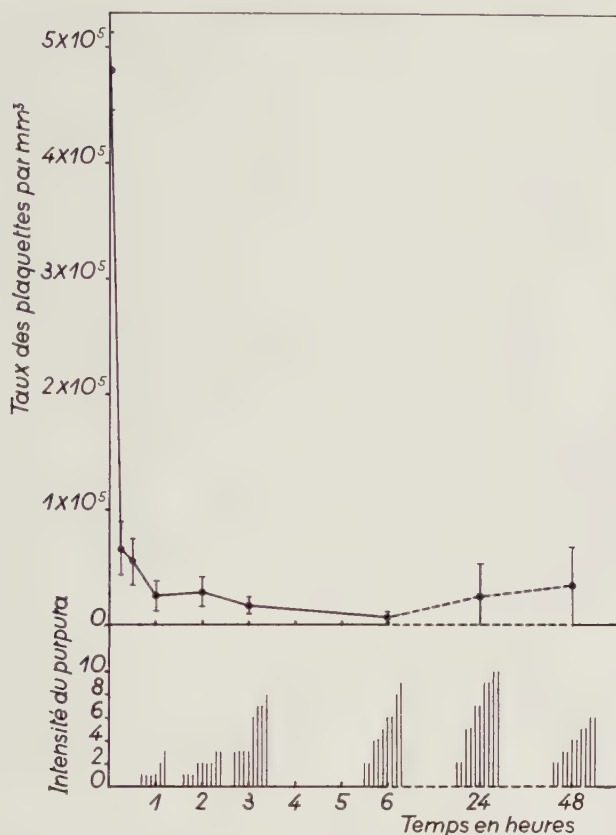


FIG. 21. Evolution du taux des plaquettes et intensité du purpura mesurées à divers délais après l'injection intra-veineuse du sérum anti-plaquettes, à des rats répartis par groupes de 10.

Dans la partie supérieure : en ordonnées, taux moyen des plaquettes par mm^3 ; de part et d'autre de la moyenne entre les traits horizontaux, les variations non significatives ; en abscisses, temps exprimé en heures.

Dans la partie inférieure, en ordonnées, intensité du purpura chiffrée de 1 à 10 ; en abscisses, temps en heures. Chaque trait vertical correspond à l'un des rats atteint de purpura dans chaque groupe de 10 animaux.

3. Discussion.

Cette étude cinétique du purpura thrombopénique induit par l'injection intra-veineuse de sérum anti-plaquettes, montre qu'il existe un certain délai entre l'installation de la thrombopénie, très précoce, rappé-

lons-le, et l'éclosion des premières pétéchiées décelables au microscope. De plus, le purpura, fugace, tend à disparaître malgré la persistance d'une thrombopénie intense.

Les lésions vasculaires qui, à l'examen du mésentère, apparaissent comme une simple rupture de la paroi suivie d'une extravasation sanguine, ne peuvent donc être liées à la seule diminution du taux des plaquettes. Il faut d'ailleurs rappeler que certains rats ayant une thrombopénie intense, ne présentent que peu ou pas de purpura, observation qui, on le sait, est d'ailleurs courante en pathologie humaine.

La cinétique des phénomènes suggère que la lésion vasculaire serait induite par un facteur apparaissant après une certaine latence et de façon fugace, dans la circulation. A nos yeux, il serait libéré sous l'action du sérum anti-plaquettes réagissant avec les antigènes homologues. Rappelons que BEDSON (1922), utilisant des animaux rendus thrombopéniques par le mélange sérum-agar, provoque la lésion vasculaire en injectant un sérum anti-hématics. Quant à ROSKAM (1934), il induit cette lésion, chez des lapins rendus thrombopéniques par irradiation X, à l'aide d'une faible dose non thrombopénisante de sérum anti-plaquettes.

On sait, depuis les travaux de NOLF (1905), que le choc anaphylactique et les manifestations anaphylactoïdes s'accompagnent d'activation d'enzymes protéolytiques et, en particulier, fibrinolytiques. Cette conception a été développée récemment dans divers travaux (UNGAR *et al.*, 1961 ; GANS *et al.*, 1961 ; SALMON et LECOMTE, 1963a). De plus, il a été démontré que la réaction antigène-anticorps se déroulant *in vitro* dans du plasma ou du sérum, s'accompagne de l'activation d'enzymes protéolytiques (UNGAR *et al.*, 1949, 1955).

D'autre part, MOVAT et FERNANDO (1963), utilisant la microscopie électronique, viennent tout récemment de montrer que les phénomènes allergiques de type immédiat s'accompagnent de lésions vasculaires, vraisemblablement d'origine humorale. Ils observent en effet des solutions de continuité dans la paroi des vaisseaux dès la formation de complexes antigènes-anticorps dans le torrent circulatoire. Les pertuis ainsi formés permettent ensuite le passage de globules rouges, de leucocytes et de plaquettes au travers des brèches endothéliales.

Notons enfin que le tube digestif est généralement le lieu d'apparition des premières pétéchiées. Il apparaît fortement congestionné, comme on le rencontre lors du choc anaphylactique du rat (SANYAL et WEST, 1958). Dans cet état, on observe une importante vaso-dilatation au niveau des viscères abdominaux, des plaques ecchymotiques sur l'intestin ainsi que des hémorragies microscopiques dans la sous-muqueuse.

Ces divers éléments qu'apportent les recherches réalisées tant *in vitro* qu'*in vivo*, nous ont suggéré que la lésion vasculaire pourrait être secondaire à une activation d'agents protéolytiques faisant suite au déclenchement de processus anaphylactiques. Les enzymes libérés par la réaction antigène-anticorps fragiliseraient l'endothélium vasculaire.

4. Conclusions.

1) L'étude de la cinétique du purpura expérimental, que produit chez le rat l'injection intra-veineuse de sérum anti-plaquettes, montre que la thrombopénie est d'installation presque immédiate.

2) Les lésions purpuriques engendrées par le sérum anti-plaquettes n'apparaissent qu'après un certain délai, même lorsqu'on les recherche au microscope. D'autre part, elles tendent à disparaître alors que la thrombocytose demeure basse.

3) Nos observations suggèrent que le sérum anti-plaquettes induit des lésions vasculaires fugaces, ne s'installant qu'après une période de latence. De telles altérations pourraient s'expliquer par des phénomènes de protéolyse et, en particulier, de fibrinolyse, que déclenche la réaction antigène-anticorps.

CHAPITRE IV

ROLE DE LA FIBRINOLYSE DANS LA GENÈSE DES PÉTÉCHIES APPARAISSANT LORS DU PURPURA THROMBOPÉNIQUE IMMUNOLOGIQUE

L'étude de la cinétique du purpura thrombopénique qu'induit, chez le rat, l'injection intra-veineuse de sérum anti-plaquettes, suggère l'intervention d'un processus protéolytique dans la genèse des altérations vasculaires, nécessaires à l'apparition des pétéchies.

Puisque les réactions anaphylactiques peuvent activer le système fibrinolytique, ainsi qu'il a été signalé au chapitre précédent, nous avons essayé de mettre en évidence une pareille activation enzymatique chez les rats injectés de sérum anti-plaquettes, puis de déterminer le rôle de la fibrinolyse dans la pathogénie des lésions vasculaires.

A. ACTIVATION DU SYSTÈME FIBRINOLYTIQUE

1. Matériel et méthodes.

Vingt rats d'environ 350 g, répartis en groupes de 5, ont été anesthésiés au nembutal. Après ouverture de la cavité abdominale, 0,9 ml de sang sont prélevés sur 0,1 ml d'une solution de citrate trisodique à 3,8 %, par ponction de la veine cave chez chacun d'eux. Cinq rats reçoivent ensuite 1 ml de sérum anti-plaquettes spécifique (APl/P) ; 5 autres sont injectés de 1 ml de sérum anti-fibrinogène de rat (AF-I/S) ; 5 autres, enfin, reçoivent 1 ml de sérum de lapin normal. Toutes ces injections sont faites dans la veine cave. Les 5 derniers rats ne subissent aucune injection.

Quinze et 30 minutes plus tard, on prélève à nouveau 1 ml de sang citraté, à la veine cave.

De chaque échantillon, conservé sur glace, on sépare le plasma pour en isoler ensuite les euglobulines (1^{re} partie, chapitre 2, page 38). L'activité fibrinolytique de ces dernières est alors mesurée sur plaques de fibrine, chauffée ou non, selon la technique d'ASTRUP (chapitre 2, p. 38).

2. Résultats.

Le tableau VIII résume l'ensemble des mesures d'activité fibrinolytique réalisées sur les sangs prélevés chez les 20 rats. On constate que l'injection intra-veineuse du sérum anti-plaquettes augmente dès la 15^e minute, chez chaque rat, l'activité fibrinolytique des euglobulines sur plaques de fibrine, normale ou chauffée. Elle provoque donc la libération d'activateurs du système fibrinolytique dans la circulation et déclenche ainsi la formation de plasmine, active sur plaque de fibrine chauffée.

L'injection du sérum anti-fibrinogène produit une semblable activation du système fibrinolytique que n'induit pas le sérum de lapin normal.

Enfin, le simple choc opératoire ne peut expliquer l'activation du système fibrinolytique, puisque la surface lysée par les euglobulines, isolées du sang prélevé 15 et 30 minutes après l'intervention abdominale, ne subit jamais d'augmentation pareille à celle observée après injection de sérum anti-plaquettes ou anti-fibrinogène.

L'augmentation de l'activité fibrinolytique n'est pas un phénomène propre à l'action du sérum anti-plaquettes, puisqu'elle se retrouve après injection intra-veineuse de sérum anti-fibrinogène.

Il s'agit donc, très vraisemblablement, d'un processus non spécifique, secondaire à une réaction antigène-anticorps se déroulant dans la circulation.

B. INHIBITION DE L'ACTIVITÉ DU SYSTÈME FIBRINOLYTIQUE

Les expériences décrites dans le paragraphe précédent démontrent que l'injection de sérum anti-plaquettes déclenche, chez le rat, une activation du système fibrinolytique. Toutefois, elles ne permettent pas d'affirmer que les enzymes libérés jouent un rôle dans la production des lésions purpuriques. Nous avons donc étudié l'influence d'agents anti-

TABLEAU VIII

Traitement subi	Rats	Surface lysée par les euglobulines sur					
		plaque normale			plaque chauffée		
		Sang prélevé au temps			Sang prélevé au temps		
		0 min	15 min	30 min	0 min	15 min	30 min
Sérum anti-plaquettes (API/P)	n° 1	25	400	441	0	169	169
	2	81	222	289	25	64	100
	3	25	144	589	0	49	144
	4	36	121	324	0	81	100
	5	16	144	361	9	64	121
Sérum anti-fibrinogène (AF-I/S)	1	100	225	256	0	64	64
	2	64	256	841	0	100	144
	3	81	442	484	16	64	81
	4	49	144	400	25	121	144
	5	16	225	484	0	81	100
Sérum de lapin	1	121	100	0	64	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
	3	16	36	0	0	0	0
	4	25	16	36	9	0	0
	5	81	64	36	16	0	0
Nul	1	55	0	0	80	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
	3	64	0	0	50	0	0
	4	9	0	16	0	0	0
	5	0	64	25	0	9	16

Mesure de l'activité fibrinolytique des euglobulines isolées du sang prélevé chez des rats avant, puis 15 et 30 min après injection intraveineuse soit de sérum anti-plaquettes, soit de sérum anti-fibrinogène, soit de sérum de lapin normal, et chez d'autres rats qui n'ont subi aucune injection, mais dont le sang est ponctionné dans les mêmes conditions. Chaque valeur, exprimée en mm², est la moyenne de 3 mesures.

fibrinolytiques sur les lésions vasculaires induites par le sérum anti-plaquettes. Dans ce but, nous avons utilisé l'acide ϵ -aminocaproïque, inhibiteur de l'activation du plasminogène en plasmine (1^{re} partie, chapitre I, page 34).

1. Matériel et méthodes.

Comme antérieurement, nous avons induit du purpura thrombopénique à l'aide de sérum anti-plaquettes (API/P) introduit chez des rats d'environ 150 g, par voie intra-veineuse ou sous-cutanée à la dose de 0,65 ml.

L'acide ϵ -aminocaproïque, en solution à 10 % en eau distillée, est injecté lentement par voie intra-veineuse à la dose de 30 mg, à différents moments par rapport à l'administration de l'anti-sérum, soit 24 heures avant, puis une seconde dose avec API/P, soit 1 heure avant, soit avec l'anti-sérum, soit encore 30 minutes ou 1 heure après cette injection. Les rats injectés du sérum API/P par voie sous-cutanée, reçoivent au même moment l'acide ϵ -aminocaproïque dans une veine de la queue. Certains animaux servant de témoins ne reçoivent pas l'acide aminé.

Chaque rat est sacrifié à la 24^e heure après l'injection du sérum anti-plaquettes. Un échantillon de sang prélevé au cœur permet de dénombrer les plaquettes. Les animaux sont ensuite soumis à une autopsie minutieuse, à l'occasion de laquelle on note le nombre et l'étendue des taches purpuriques.

2. Résultats.

Le sérum anti-plaquettes injecté par voie **intra-veineuse** à des groupes de 6 rats, induit, après 24 heures, une intense thrombopénie, que les animaux aient ou non reçu de l'acide ϵ -aminocaproïque (Tableau IX).

Chez les rats injectés du seul anti-sérum par voie intra-veineuse, on découvre un important purpura généralisé, particulièrement intense au niveau de l'intestin et sur la queue.

Les animaux qui ont reçu une première dose d'acide ϵ -aminocaproïque 24 heures avant, puis une seconde en même temps que l'anti-sérum, ne développent que de rares pétéchies. Ceux qui l'ont reçue une heure avant le sérum anti-plaquettes ne font pas de purpura. Celui-ci

est encore très rare si l'acide aminé est injecté au même moment que l'anti-sérum ou 30 minutes plus tard. Il devient plus abondant lorsque l'inhibiteur est administré une heure plus tard (Tableau IX).

TABLEAU IX

Rats injectés de API/P		Rats injectés de API/P et d'acide ϵ -aminocaproïque									
		24 heures avant et avec sérum		1 heure avant sérum		avec sérum		30 min. après sérum		1 heure après sérum	
pl	purp	pl	purp	pl	purp	pl	purp	pl	purp	pl	purp
3300	+++	100	±	100	0	100	+	100	0	100	+
100	+++	2200	±	100	0	100	±	1750	±	100	+
1430	+++	1100	+	100	0	4400	±	2200	+	100	+
5940	++	550	0	1100	0	5170	±	5500	0	2530	+
3300	+++	4950	0	3300	0	330	0	3740	±	6600	+
400	+++	100	0	1540	±	4630	±	100	0	100	+

Taux des plaquettes par mm³ (pl) et intensité du purpura (purp) mesurés chez des rats injectés par voie intra-veineuse de sérum anti-plaquettes, et ayant reçu ou non de l'acide ϵ -aminocaproïque à différents moments par rapport à l'injection d'anti-sérum.

Les rats injectés de sérum anti-plaquettes par voie **sous-cutanée** développent une large lésion ecchymotique à l'endroit d'injection ainsi qu'un important purpura généralisé ayant les mêmes caractères que celui qui se manifeste après injection intra-veineuse.

L'administration par voie intra-veineuse de 30 mg d'acide ϵ -aminocaproïque, au moment de l'injection sous-cutanée de l'anti-sérum, n'inhibe en rien l'action thrombopénisante du sérum anti-plaquettes appréciée à la 24^e heure. Par contre, elle diminue l'intensité de la réaction hémorragique locale et empêche l'apparition du purpura à distance (Tableau X).

TABLEAU X

Rats injectés de APl/P			Rats injectés de APl/P et d'acide ϵ -aminocaproïque		
pl	purpura		pl	purpura	
	loc	gén		loc	gén
5500	+++	+++	100	+	0
3300	+++	+++	4400	+	0
100	+++	+++	1600	++	0
6930	+++	+++	4125	+	0
1000	+++	++	5500	++	0
2420	++	+++	11550	+	0

Taux des plaquettes (pl) et intensité du purpura local (loc) et général (gén), mesurés chez des rats injectés de sérum anti-plaquettes, par voie sous-cutanée, et ayant reçu ou non de l'acide ϵ -aminocaproïque.

3. Discussion.

Les observations que nous venons de décrire montrent à nouveau que le purpura thrombopénique immunologique n'est pas la conséquence de la seule chute du taux des plaquettes. Nous apportons maintenant une preuve directe de la dualité pathogénique de ce purpura, en dissociant thrombopénie et lésion vasculaire.

Les altérations de l'endothélium ne semblent pas liées à une action directe des anticorps anti-plaquettes qui, malgré la présence d'acide ϵ -aminocaproïque, conservent leur action thrombopénisante sans léser les vaisseaux. La mise en évidence d'une activation du système fibrinolytique sous l'effet du sérum anti-plaquettes et l'effet de l'acide ϵ -aminocaproïque, inhibiteur de l'activation du plasminogène en plasmine, suggère que le purpura thrombopénique immunologique, dans sa composante vasculaire, dépend de phénomènes protéolytiques, vraisemblablement fibrinolytiques. Puisque la réaction entre l'anti-sérum et les plaquettes active secondairement le système fibrinolytique, il est vrai-

semblable que l'acide ϵ -aminocaproïque intervient à ce second échelon en inhibant le processus d'activation enzymatique, alors qu'il n'influence nullement la réaction antigène-anticorps.

L'action inhibitrice de l'acide ϵ -aminocaproïque sur le purpura qu'induit l'injection intra-veineuse de sérum anti-plaquettes est particulièrement nette lorsqu'il est injecté une heure avant l'anti-sérum. Administré 24 heures avant et en même temps que l'anti-sérum, il manifeste un effet nettement moins marqué. Mais il faut savoir que cette substance de petite taille est éliminée en quelques heures par le rein (NILSON *et al.*, 1960). D'autre part, on conçoit aisément qu'il ne peut être pleinement efficace que s'il est injecté en quantité suffisante et immédiatement avant l'anti-sérum. En effet, son action consiste à neutraliser un activateur du plasminogène que libère la réaction antigène-anticorps.

Lorsque les rats reçoivent le sérum anti-plaquettes par voie sous-cutanée, l'effet inhibiteur de l'acide ϵ -aminocaproïque est essentiellement marqué sur les pétéchies apparaissant à distance. Leur pathogénie semble identique à celle des lésions qui surviennent, plus précocement, lors de l'injection intra-veineuse. Quant à la lésion locale, elle est partiellement inhibée par l'acide ϵ -aminocaproïque qui diminue l'intensité des hémorragies. Rappelons que celle-ci présente les caractères d'un phénomène d'ARTHUS, fortement hémorragique.

L'acide ϵ -aminocaproïque joue d'ailleurs un rôle dans d'autres phénomènes immunologiques. Une importante littérature est actuellement consacrée à cette action : il inhibe le choc anaphylactique (OTTO-SERVAIS et LECOMTE, 1961) et les réactions anaphylactoïdes (SODOYEZ et LECOMTE, 1961) ; il diminue l'effet des injections d'endotoxines et réduit l'intensité du phénomène de SHWARTZMAN (ZWEIFACH *et al.*, 1961).

Tous ces faits suggèrent que la fibrinolyse pourrait jouer un rôle dans des processus immunologiques variés. Selon certains, la plasmine serait l'agent qui déclenche la libération de divers médiateurs de la réaction allergique, telles l'histamine, la sérotonine, la bradykinine, la kallidine, etc. (ROCHA e SILVA, voir littérature dans LEWIS, 1960).

4. Conclusions.

1) L'injection intra-veineuse de sérum anti-plaquettes provoque une activation du système fibrinolytique.

2) Cette activation est vraisemblablement secondaire à la réaction antigène-anticorps se déroulant dans le torrent circulatoire. Elle n'est

pas spécifique de la réaction plaquettes-sérum anti-plaquettes, puisque l'injection intra-veineuse de sérum anti-fibrinogène produit la même activation du système fibrinolytique.

3) L'activation du système fibrinolytique semble responsable des altérations vasculaires nécessaires à l'apparition des pétéchies dans le purpura thrombopénique immunologique, puisque l'acide ϵ -amino-caproïque, inhibiteur de cette activation, entrave la genèse du purpura induit normalement par le sérum anti-plaquettes.

CHAPITRE V

ROLES RESPECTIFS DE LA THROMBOPÉNIE ET DU PHÉNOMÈNE IMMUNOLOGIQUE DANS LA PRODUCTION DES ALTÉRATIONS VASCULAIRES : PURPURA DISSOCIÉ

LES expériences d'inhibition du purpura thrombopénique immunologique par un anti-activateur de la fibrinolyse, l'acide ϵ -aminocaproïque, apportent de nouveaux éléments en faveur de sa double pathogénie, puisqu'il est possible d'entraver la genèse des pétéchies sans inhiber la thrombopénie. Dans le but de mieux asseoir encore cette dualité pathogénique, nous avons tenté de dissocier la thrombopénie du phénomène immunologique, non plus en inhibant l'un des composants du complexe, mais en essayant de provoquer chacun d'eux isolément, puis de les combiner. Nous espérons de la sorte reproduire certains accidents rencontrés en pathologie humaine, telles les thrombopénies chroniques compliquant les aplasies médullaires et dont l'aspect hémorragique sera discuté ultérieurement.

Ce travail nous a été inspiré des recherches de ROSKAM (1934), puis de ceux de l'école de JAKES (1961). Ces auteurs ont pu montrer qu'il existe au moins 3 facteurs prévenant toute hémorragie spontanée. Ce sont : les plaquettes, responsables de la formation du clou hémostatique, le système de coagulation aboutissant à la formation de fibrine, et enfin le maintien de l'intégrité des parois vasculaires. Le défaut d'au moins deux de ces facteurs conduit aux hémorragies. Afin d'individualiser leur rôle, CALARESU et JAKES (1960) ont soumis des rats aux traitements suivants : injection de P^{32} pour induire une thrombopénie, administration de dicoumarol pour produire une hypocoagulabilité, injection de chlorure sodique en solution hypertonique afin de provoquer un **stress** non spécifique et de léser ainsi la paroi vasculaire. On rappellera à ce propos que le **stress** est susceptible d'entraîner une libération

d'activateur de la fibrinolyse dans le torrent circulatoire (MACFARLANE *et al.*, 1946). Le rôle de la plasmine dans la lésion vasculaire mérite donc d'être envisagé.

Nous avons tenté de confirmer la double pathogénie du purpura thrombopénique immunologique en provoquant une thrombopénie à l'aide de P^{32} et en lésant les vaisseaux par la plasmine ou par une réaction antigène-anticorps qui, ainsi que nous l'avons montré plus haut (chapitre 4), peut activer le système fibrinolytique.

1. Matériel et méthodes.

Septante rats pesant environ 200 g ont reçu 11 jours avant l'expérimentation 800 μC de P^{32} sous forme d'une solution isotonique stérile de Na_3PO_4 , injectée par voie intrapéritonéale. Treize d'entre eux succombèrent avant le second stade de l'expérimentation.

Le 11^e jour, les plaquettes furent dénombrées sur un prélèvement de sang, pratiqué à l'aide d'une seringue et d'une aiguille siliconées, dans une veine de la queue préalablement chauffée dans de l'eau à 45-50°C. La thrombocytose, le plus souvent en dessous de 5.000 éléments par mm^3 , oscillait entre les limites extrêmes : 0 et 21.500.

Afin d'induire une fibrinolyse chez le rat, nous avons utilisé la streptokinase. Or celle-ci est inactive sur le plasma du rat. En effet, cet animal ne possède pas le proactivateur qui, sous l'action de la streptokinase, sera transformé en activateur du plasminogène en plasmine (voir 1^{re} partie, chapitre I, page 31). Nous avons donc fourni ce proactivateur à nos rats sous forme de plasma humain injecté par voie intra-veineuse avec la streptokinase. La streptokinase utilisée pour ces essais est la « Varidase LEDERLE », mélange de streptokinase et de streptodornase.

Par ailleurs, certains animaux ont reçu du sérum anti-fibrinogène de rat (AF-I/S), dont la préparation a été décrite antérieurement (2^e partie, chapitre 1, page 63). Certains ont été injectés de sérum anti-ovalbumine, immunsérum obtenu chez le lapin avec une solution d'ovalbumine purifiée administrée par voie intra-veineuse pendant 4 semaines, à raison de 4 fois 0,5 ml d'une solution à 1 %, par semaine.

Des cinquante-cinq rats survivant au 11^e jour et dont les thrombocytes ont été dénombrés, 15 ont reçu 0,5 ml de liquide physiologique par voie intra-veineuse. Ils constituent le premier lot et servent de témoins. Les autres, par lots de 5, ont été soumis à divers traitements administrés par voie intra-veineuse :

- 1) 0,5 ml de plasma humain ;

- 2) 10.000 unités de streptokinase ;
- 3) 5.000 unités de streptokinase et 0,5 ml de plasma humain ;
- 4) 10.000 unités de streptokinase et 0,5 ml de plasma humain ;
- 5) 0,65 ml de sérum anti-fibrinogène de rat ;
- 6) 0,5 ml de sérum anti-ovalbumine ;
- 7) 0,5 ml d'une solution d'ovalbumine à 1 % ;
- 8) 0,5 ml de sérum anti-ovalbumine puis, 2 heures plus tard, 0,5 ml d'une solution d'ovalbumine à 1 %.

Les rats injectés de streptokinase et de plasma humain ont été tués à l'éther après 6 heures ; les autres, après 24 heures. Après une prise de sang au cœur pour y dénombrer les plaquettes, ils ont été soumis à un examen autopsique attentif.

En outre 55 rats normaux, n'ayant pas reçu de P^{32} , subirent également, par lots de 15 ou de 5, des traitements identiques.

2. Résultats (Tableau XI).

TABLEAU XI

Traitements subis	Effet hémorragique	
	Rats normaux	Rats injectés de P^{32}
Liquide physiologique	0	0
Plasma humain	0	rares pétéchie
Streptokinase	0	rares pétéchie
Plasma humain et streptokinase . .	0	purpura généralisé
Sérum anti-fibrinogène	0	fin purpura généralisé
Sérum anti-ovalbumine	0	rares pétéchie
Ovalbumine	0	rares pétéchie
Sérum anti-ovalbumine, puis ovalbumine	0	fin purpura généralisé

Action purpurigène de divers traitements chez des rats normaux et chez d'autres rendus thrombopéniques par l'injection préalable de phosphore radioactif (P^{32}).

a) Les **rats non thrombopéniques**, non injectés de P^{32} , n'ont jamais développé de purpura, quel qu'ait été le traitement auquel ils ont été soumis.

b) Les **rats thrombopéniques**, traités au seul P^{32} , bien qu'ayant un taux de plaquettes très bas, montrent parfois des ecchymoses, du melaena, mais ils ne développent pas de lésions pétéchiâles.

Chez ces animaux, dépourvus de plaquettes, l'injection de plasma humain, de streptokinase, d'ovalbumine ou encore de sérum anti-ovalbumine, provoque parfois de rares pétéchiâs. Par contre, soumis à l'injection du mélange plasma humain-streptokinase qui induit une fibrinolyse efficace, confirmée par l'action de leurs euglobulines sur plaque de fibrine d'ASTRUP (Tableau XII), les rats thrombopéniques développent, en 6 heures, un important purpura généralisé.

Les animaux thrombopéniques qui reçoivent dans une veine de la queue 0,65 ml du sérum anti-fibrinogène ou le sérum anti-ovalbumine, puis l'ovalbumine, présentent également un fin semis purpurique, mais moins intense que celui induit par le plasma humain-streptokinase. Ce purpura ne peut s'expliquer, après injection de sérum anti-fibrinogène, par un abaissement du taux de fibrinogène qui demeure entre des limites normales (voir chapitre 2, page 83).

3. Discussion.

Dans les expériences que nous venons de décrire et qui confirment à nouveau que la seule thrombopénie ne peut expliquer la genèse des pétéchiâs dans le purpura thrombopénique, le phosphore radioactif a provoqué une thrombopénie par insuffisance de production des plaquettes et non par leur destruction dans le torrent circulatoire, comme le fait le sérum anti-plaquettes ou l'injection de substances, telle la gélatine.

L'administration de P^{32} est certes suivie, en plus de la thrombopénie, d'autres effets que nous ne méconnaissons pas. Toutefois, notre but en utilisant cet élément radioactif était d'induire une thrombopénie pure de type chronique, sans purpura associé, résultat que nous avons obtenu.

Il nous a alors été possible de démontrer que l'activation du système fibrinolytique du rat par le mélange plasma humain-streptokinase est particulièrement toxique pour les parois vasculaires, lorsqu'elle survient chez des animaux atteints d'une thrombopénie pure. Elle déclenche alors chez eux un important purpura généralisé.

TABLEAU XII

	Surface lysée par la solution d'euglobulines sur	
	plaque normale	plaque chauffée
Rats normaux	21	0
	64	25
	49	16
	9	0
	1	25
Rats + plasma humain + S.K. 5.000 unités (6 heures)	360	169
	180	156
	529	100
	313	105
	471	120
Rats + plasma humain + S.K. 10.000 unités (6 heures)	175	108
	181	90
	419	232
	319	108
	396	162

Activités fibrinolytiques des euglobulines isolées chez des rats normaux et chez d'autres injectés, 6 heures plus tôt, du mélange plasma humain-streptokinase, mesurées sur plaque de fibrine normale et chauffée, selon la technique d'ASTRUP. Chaque valeur, exprimée en mm², est la moyenne de 3 mesures.

Il faut d'ailleurs signaler que, si cette activation du système fibrinolytique n'engendre à elle seule ni purpura ni hémorragie, elle est cependant responsable, chez les animaux non thrombopéniques, d'une importante vaso-dilatation au niveau du tube digestif et d'une certaine congestion du cœur droit. Semblable constatation a d'ailleurs été faite chez le lapin, dont le système fibrinolytique a été activé par la streptokinase (SALMON et LECOMTE, 1963a).

De même, l'injection intra-veineuse du sérum anti-fibrinogène ne peut, à elle seule, induire du purpura (chapitre 2, page 83), mais chez les animaux rendus thrombopéniques, elle provoque l'apparition de pétéchies. Cet effet ne peut être lié à une chute du taux de fibrinogène circulant, mais il est vraisemblablement une des conséquences non spécifiques de la réaction antigène-anticorps. Rappelons que l'injection de cet anti-sérum par voie intra-veineuse active le système fibrinolytique du rat (chapitre 4, page 98).

Enfin, le sérum anti-ovalbumine, réagissant avec l'antigène homologue chez le rat thrombopénique, engendre également un fin purpura. Cette réaction qui se déroule dans le torrent circulatoire doit vraisemblablement y déclencher la libération d'enzymes fibrinolytiques.

La similitude des effets que provoquent l'injection d'un mélange de streptokinase et de plasma humain, celle de sérum anti-fibrinogène de rat, ou encore les injections successives et convenablement espacées de sérum anti-ovalbumine, puis d'ovalbumine, suggère que, chez les rats rendus thrombopéniques par le P³², ces divers traitements lèsent la paroi vasculaire d'une façon identique. Tous ont en commun la propriété de provoquer une activation du système fibrinolytique.

Ces résultats venant s'ajouter à nos observations sur l'inhibition du purpura thrombopénique expérimental par l'acide ϵ -aminocaproïque nous font penser que le système fibrinolytique joue un rôle dans la pathogénie des lésions vasculaires responsables de l'apparition des pétéchies.

4. Conclusions.

1) La seule thrombopénie induite chez le rat par l'administration de phosphore radioactif n'engendre pas de purpura.

2) L'activation du système fibrinolytique dans le torrent circulatoire du rat ne provoque ni hémorragie ni lésion pétéchiale.

3) L'induction d'une activité fibrinolytique anormale déclenche, chez le rat thrombopénique, un important purpura généralisé.

4) L'activation du système fibrinolytique provoque donc, chez le rat thrombopénique, des altérations vasculaires qui permettent l'éclosion des lésions purpuriques.

CHAPITRE VI

ROLE DU COMPLÉMENT DANS LE PHÉNOMÈNE IMMUNOLOGIQUE

LES chapitres antérieurs ont mis en évidence le rôle que joue le système fibrinolytique dans la production des lésions vasculaires responsables des manifestations pétéchiales du purpura thrombopénique immunologique. L'activation de ce système enzymatique peut être observée à la suite d'une réaction antigène-anticorps, et notamment de la réaction plaquettes-sérum anti-plaquettes *in vivo*.

Selon les travaux d'UNGAR *et al.* (1953), réalisés *in vitro*, l'activation du plasminogène en plasmine, par la réaction antigène-anticorps, nécessiterait l'intervention du complément. D'autre part, divers travaux ont mis en évidence le rôle actif que joue le complément dans plusieurs types de phénomènes immunologiques. On estime en effet, depuis plusieurs années, que le complément serait un médiateur, et non un témoin passif, des réactions d'hypersensibilité (OSLER, 1961) : l'activité hémolytique du sérum vis-à-vis d'hématies sensibilisées diminue lors du choc anaphylactique expérimental ; de plus, elle est basse chez les patients atteints d'une affection qui relève, semble-t-il, d'un processus immunologique, tel le lupus érythémateux systémique.

Divers auteurs ont tenté de préciser le rôle du complément dans les phénomènes anaphylactiques en cherchant si son abaissement est simplement contemporain de la réaction antigène-anticorps, ou si sa fixation est nécessaire à la libération des médiateurs provoquant les désordres finaux de la réaction d'hypersensibilité. Dans ce but, ils ont étudié l'effet que produit la réduction préalable du taux de complément, sur divers aspects de cette réaction : l'anaphylaxie cutanée passive (OSLER *et al.*, 1957), l'activation protéolytique du plasma (UNGAR *et al.*, 1953), la libération de sérotonine et d'histamine par les tissus sensibilisés (UNGAR *et al.*, 1955). Ces diverses manifestations sont inhibées par la réduction du taux de complément. Par contre, l'accroissement de ce dernier par

apport exogène restaure la réactivité normale de l'animal ou du système utilisé. Signalons enfin que, disposant de lapins privés génétiquement de la troisième fraction du complément, ROTHER (1963) a constaté que ces animaux ne réagissent pas à la provocation du phénomène d'ARTHUS. L'injection de complément exogène permet par contre l'apparition de ce phénomène.

Sur la base de ces travaux, il nous a dès lors paru intéressant de rechercher si l'intervention du complément était nécessaire à la genèse des altérations vasculaires du purpura thrombopénique.

1. Matériel et méthodes.

a) Nous avons utilisé des rats albinos, d'environ 200 g, répartis en 2 groupes de 10 rats. L'un sert de témoin, l'autre subit la décomplémentation.

b) L'abaissement du taux de complément circulant a été provoqué par la technique d'OSLER *et al.* (1957), à l'aide du système ovalbumine-sérum anti-ovalbumine*.

Afin de déterminer le point de fixation maximale du complément par le système ovalbumine et anticorps homologues, nous avons établi une courbe de précipitation quantitative en présence de 30 unités H_{50} (une unité H_{50} de complément est la quantité de ce réactif qui, dans des conditions, définies, donne 50 % d'hémolyse). Dans ces conditions, les proportions optimales de nos réactifs ont été : 0,5 mg d'ovalbumine pour 1 ml d'anti-sérum.

Pour assurer la décomplémentation, nous avons injecté aux rats 1 ml d'anti-sérum dans une veine de la queue et 0,6 ml d'ovalbumine — soit un léger excès d'antigène — dans la cavité péritonéale.

c) Le dosage du complément sérique a été effectué selon la technique de KABAT et MAYER (1961) sur du sang prélevé par ponction du sinus rétro-orbitaire. Ce prélèvement est effectué sous légère narcose à l'éther, avec une pipette PASTEUR siliconée, à portion effilée très courte. La pointe de cette pipette est placée dans l'orbite, à l'angle interne de l'œil, et

* Cet anti-sérum a été obtenu de la façon suivante : 2 ml d'une solution à 1 % d'ovalbumine cristallisée, mélangés à 2 ml d'adjuvant de Freund DIFCO, sont injectés par voie sous-cutanée au lapin. Cette injection est répétée 12 jours plus tard. Le 22^e jour, l'animal reçoit 0,25 ml de la solution d'ovalbumine par voie intra-veineuse.

Il est saigné à la carotide le 32^e jour.

enfoncée jusqu'au contact de l'os, qui est ensuite percé. Grâce à une compression légère de la veine jugulaire homo-latérale empêchant le retour veineux, le sang s'élève dans la pipette, permettant le prélèvement aisé de 0,5 à 0,6 ml.

d) Des ponctions sanguines pratiquées à l'un, puis à l'autre œil de chaque animal soumis à la décomplémentation, permettent le dosage du complément avant et 2 heures après le traitement, et de s'assurer ainsi qu'il a été effectivement fixé. Des essais préliminaires ont montré qu'un délai de 2 heures donne les meilleurs résultats. Ces 10 rats reçoivent ensuite, en injection intra-veineuse, 0,65 ml du sérum anti-plaquettes (API/P, chapitre 2, page 62), inactivé par un chauffage de 30 minutes à 56°C.

e) Les 10 rats témoins, non soumis à la décomplémentation, subissent une prise de sang à l'orbite pour contrôler leur taux de complément. On leur injecte ensuite 0,65 ml de sérum anti-plaquettes par voie intra-veineuse. Chez 5 d'entre eux, on procède à une seconde prise de sang 15 minutes plus tard. La comparaison du taux de complément des deux prélèvements successifs permet de constater sa fixation éventuelle consécutive à une réaction plaquettes-sérum anti-plaquettes.

f) Tous les animaux, témoins et décomplémentés, anesthésiés à l'éther, subissent 18 heures après l'injection du sérum anti-plaquettes, une ponction cardiaque à thorax ouvert, pour dénombrement de leurs thrombocytes. Ils sont ensuite sacrifiés et soumis à une autopsie minutieuse comprenant particulièrement l'examen de la peau par sa face interne, des viscères et spécialement de l'intestin qui, comme nous l'avons signalé plus haut, est le premier lieu d'apparition des pétéchies.

2. Résultats.

Ceux-ci se trouvent rassemblés dans les tableaux XIII et XIV.

a) Animaux témoins.

L'injection intra-veineuse de sérum anti-plaquettes induit, chez les 10 rats témoins, une intense thrombopénie et provoque l'apparition de nombreuses pétéchies. Il faut cependant remarquer que l'intensité de la réaction purpurigène varie selon les individus.

b) Contrôle de la décomplémentation.

A la lecture du tableau XIII, on constate que l'administration simultanée d'ovalbumine, par voie intra-péritonéale, et de sérum anti-oval-

TABLEAU XII

Rats décomplémentés N°	C' H ₃₀ ml		% C' residuel	Pla- quettes	Purpura
	Au T O	Après injection OV-anti OV			
1	16	2,6	16	16.000	0
2	30	2,7	9	2.000	0
3	10,5	3,3	17	8.000	0
4	18,4	3	16	7.000	0
5	10	4,6	24	7.000	0
6	10,2	1,2	6	2.000	0
7	24	1	4	8.000	0
8	19	1	5	15.000	0
9	14	1,2	7	10.500	0 *
10	14,2	1	7	12.500	0
Rats normaux N°					
11	28			6.000	0
12	32			17.000	0
13	25			3.000	0
14	25			9.500	0
15	21			24.500	0
16	16			11.000	0
17	16			13.000	0
18	20			9.000	0
19	17,6			13.000	0
20	33,5			6.000	0

* intestin

Taux des plaquettes et intensité du purpura, 18 h après injection I.V. de serum anti-plaquettes, chez des rats soumis à la décomplémentation (1 à 10) et chez des rats normaux (11 à 20). Chez tous les rats, le complément est dosé avant l'expérience (%O). La décomplémentation est ensuite confirmée chez les 10 premiers rats (C' résiduel).

TABLEAU XIV

Rats	C' H ₅₀ /ml		"o C' résiduel
	Avant injection du sérum anti-plaquettes	Après injection du sérum anti-plaquettes	
n° 11	28	20	72
12	32	14	64
13	25	3	12
14	25	16	64
15	21	5.7	26

Evolution du taux de complément, mesuré chez des rats normaux, avant puis 15 minutes après injection de sérum anti-plaquettes.

(Cfr Tableau XIII)

bumine, par voie veineuse, entraîne, chez les 10 rats traités, une importante réduction du taux de complément circulant. Deux heures après ces injections, le pourcentage de complément restant en circulation est tombé entre 4 et 24 % de sa valeur primitive.

c) Effet du sérum anti-plaquettes chez les rats décomplémentés.

La réduction préalable du taux de complément circulant n'entrave en rien l'action thrombopénisante du sérum anti-plaquettes. Par contre, elle inhibe la genèse des lésions purpuriques, ainsi que le montre l'examen nécropsique réalisé à la 18^e heure (Tableau XIII). Un seul des 10 rats de ce groupe développe un purpura d'intensité moyenne sur le caecum ; mais il importe de signaler que, chez cet animal, cette portion de l'intestin était soumise à une importante distension gazeuse.

d) Evolution du complément après injection du sérum anti-plaquettes.

Comme on pouvait le suspecter, l'injection intra-veineuse du sérum anti-plaquettes, chez les rats normaux, est suivie d'une chute du taux de complément circulant. Ainsi que le montre le Tableau XIV, le complément restant en circulation après 15 minutes est réduit à des valeurs comprises entre 12 et 72 % du taux initial.

3. Discussion.

Nos résultats expérimentaux montrent que la fixation préalable du complément circulant inhibe l'apparition des pétéchies qu'induit normalement le sérum anti-plaquettes, mais n'entrave pas son action thrombopénisante. Ils montrent aussi que la réaction antigène-anticorps qui se déroule *in vivo* après injection de sérum anti-plaquettes, a pour conséquence une fixation appréciable de complément.

On peut donc penser que le complément intervient dans la genèse des altérations vasculaires présentes dans le purpura thrombopénique immunologique.

Divers éléments exposés dans les chapitres antérieurs nous incitent à penser que ces lésions vasculaires seraient secondaires à une activation d'enzymes protéolytiques et vraisemblablement fibrinolytiques, d'origine immunologique. Selon UNGAR *et al.* (1953), pareille activation nécessite l'intervention du complément. On rappellera également que, selon ces auteurs, la fixation du complément serait le premier stade d'une série de réactions en chaîne faisant intervenir plusieurs systèmes enzymatiques. Les enzymes protéolytiques activés pourraient agir directement en attaquant certaines structures, tel l'endothélium vasculaire, mais leur mode d'action principal serait vraisemblablement la libération de substances actives, comme les kinines plasmatiques, l'histamine, la 5-hydroxytryptamine et d'autres médiateurs.

Nous ralliant à ces conceptions, nous pensons que la fixation du complément au complexe plaquettes-anticorps homologues serait le premier chaînon des mécanismes aboutissant à la lésion vasculaire du purpura thrombopénique immunologique.

Un mécanisme identique permettrait d'expliquer la production des lésions vasculaires chez les animaux rendus thrombopéniques par le phosphore radioactif et injecté ensuite soit de sérum anti-fibrinogène, soit d'ovalbumine, puis de l'anti-sérum correspondant.

Si la fibrinolyse joue un rôle dans l'apparition du purpura, comme le montrent les expériences combinant thrombopénie au phosphore radioactif et activation du système fibrinolytique, il nous est actuellement impossible d'affirmer qu'elle est le seul agent responsable des lésions vasculaires du purpura thrombopénique immunologique.

En effet, comme le soulignent UNGAR *et al.* (1961), la réaction antigène-anticorps active *in vitro* comme *in vivo*, non seulement le système fibrinolytique, mais encore divers autres enzymes protéolytiques dont les substrats nous sont parfois inconnus.

D'autre part, si nos essais d'inhibition, par l'acide ϵ -aminocaproïque, du purpura qu'induit le sérum anti-plaquettes, suggèrent l'intervention du système fibrinolytique dans la genèse des altérations vasculaires, on ne peut méconnaître qu'il n'est pas encore établi de façon certaine que l'acide ϵ -aminocaproïque soit exclusivement un inhibiteur spécifique de l'activation du plasminogène en plasmine.

Des recherches sont donc encore nécessaires pour préciser la participation du système fibrinolytique dans la pathogénie du purpura thrombopénique expérimental, et pour confirmer les relations qui existeraient entre son activation et la fixation du complément.

A la fin de cette discussion, une remarque s'impose : on peut en effet considérer que les injections pratiquées dans le but d'obtenir la décomplémentation du rat, ont mené cet animal dans un état d' « antianaphylaxie », c'est-à-dire dans une situation telle qu'il est incapable de réagir à des nouveaux **stimuli** destinés à induire un choc anaphylactique. Toutefois, de nouvelles recherches sont nécessaires pour différencier cet état de celui que provoque la simple déficience en complément.

4. Conclusions.

1) La lésion vasculaire, responsable de l'apparition des pétéchies dans le purpura thrombopénique immunologique, est inhibée, chez le rat, par la décomplémentation préalable de l'animal.

2) Dans ce purpura, le complément pourrait jouer le rôle de médiateur entre la réaction plaquettes-sérum anti-plaquettes et l'activation des enzymes fibrinolytiques qui engendrent les lésions vasculaires.

CHAPITRE VII

RECHERCHE DU LIEU D'ACTION DES ENZYMES FIBRINOLYTIQUES RESPONSABLES DE LA LÉSION VASCULAIRE

L'INTERVENTION du système fibrinolytique paraît très vraisemblable dans la pathogénie du purpura thrombopénique immunologique. Toutefois, son substrat précis doit encore être déterminé.

Certains auteurs estiment qu'un dépôt de fibrine sur la paroi vasculaire serait le stade initial de l'artériosclérose (DUGUID, 1959). D'autres chercheurs, utilisant le microscope électronique, prétendent que l'endothélium est recouvert, à l'état normal, de fibres de fibrine (LEVENE, 1956 ; ROSS, 1957). Cette dernière opinion est cependant très discutée, car, par la méthode des anticorps fluorescents, il n'a pas été possible de déceler de fibrine ni sur les parois vasculaires ni dans les tissus normaux (GITLIN, 1959).

Admettant comme hypothèse de travail la théorie de la « balance hémostatique » d'ASTRUP (1958), selon laquelle il existerait chez l'individu sain un équilibre entre une coagulation et une fibrinolyse continues, nous avons essayé de rompre cet équilibre en injectant à des rats normaux, de façon prolongée, un inhibiteur du système fibrinolytique. Nous espérons ainsi favoriser le dépôt sur les parois vasculaires de matériel fibrineux décelable par les techniques d'immunofluorescence.

1. Matériel et méthodes.

a) Traitement des animaux.

Nous avons utilisé, pour nos essais, des rats albinos pesant 200 g.

Neuf d'entre eux ont reçu, 6 jours par semaine, en injection intrapéritonéale, 0,5 ml d'une solution d'acide ϵ -aminocaproïque à 10 %.

Trois rats ont été tués après 10 jours, 3 autres après 20 jours, et les 3 derniers le 30^e jour.

Six autres rats ont été injectés au même rythme pendant 30 jours, d'inhibiteur de KUNITZ (Iniprol ; voir 1^{re} partie, chapitre 1, page 34), à la dose de 10.000 unités par jour. Rappelons que cette substance inhibe non seulement la trypsine, mais aussi la plasmine.

Six rats normaux, élevés dans les mêmes conditions que les précédents et injectés de liquide physiologique, suivant les mêmes modalités, ont servi de témoins.

b) Technique histologique.

Des prélèvements tissulaires ont été réalisés sous narcose à l'éther, immédiatement avant la mort. Nous avons ainsi prélevé des fragments de rein, de foie et de poumon.

Ces pièces, aussitôt congelées à la neige carbonique, sont débitées, dans un cryostat, en coupes de 5 μ d'épaisseur. Après légère fixation par un séjour de 3 minutes dans le méthanol, les préparations sont lavées dans de l'eau physiologique tamponnée à pH 7 par des phosphates.

c) Anti-sérums.

Les sérums anti-fibrinogène et anti-plaquettes de rat (AF-I/S et APl/P) ont été obtenus chez le lapin (chapitre 2, page 62).

Leur conjugaison à l'isothiocyanate de fluorescéine se fait selon la méthode décrite par COCHRANE (1960).

Nous avons en plus utilisé du sérum de chèvre anti- γ -globulines de lapin, marqué à la fluorescéine.

d) Technique immunologique.

Pour mettre en évidence aussi bien la fibrine que le fibrinogène, au niveau des parois vasculaires, nous utilisons le sérum anti-fibrinogène. Comme nous le verrons plus loin, ces deux substances sont antigéniquement très proches, Deux procédés ont été utilisés dans ce but.

1) Procédé en un temps : Les coupes histologiques sont couvertes de sérum anti-fibrinogène marqué à la fluorescéine. En principe, la fluorescence observée en lumière ultra-violette révèle la présence et la localisation du fibrinogène ou de la fibrine. Il est cependant indispensable de s'assurer de la spécificité de la réaction par plusieurs contrôles. Un sérum dirigé contre les constituants du rat autres que le fibrinogène

(nous avons utilisé API/P) et marqué à la fluorescéine ne doit pas donner ces mêmes images de fluorescence. D'autre part, les coupes, d'abord traitées par un sérum anti-fibrinogène non marqué, lavées, puis mises en contact avec du sérum anti-fibrinogène fluorescent, ne doivent pas non plus montrer de fluorescence, l'antigène bloqué par l'anticorps homologue normal ne pouvant ensuite se combiner à l'anticorps conjugué.

2) Procédé en deux temps : Les coupes histologiques sont en premier lieu couvertes de sérum anti-fibrinogène normal (lapin), puis après lavage, de sérum marqué anti- γ -globulines de lapin.

L'examen de nos préparations se fait au microscope à contraste de phase, en lumière ordinaire et en lumière ultra-violette, comme nous l'avons décrit plus haut (chapitre 1, page 66).

2. Résultats.

a) Animaux témoins.

Les coupes de foie et de rein, prélevées chez des animaux normaux, traités par le sérum anti-fibrinogène marqué, ne montrent qu'une fluorescence faible et diffuse en lumière ultra-violette. Comme nous l'avons signalé au chapitre 1, page 69, il n'y a pas de fluorescence au niveau des vaisseaux.

Sur les coupes de poumon, la fluorescence est plus intense, particulièrement dans les bronches et les alvéoles pulmonaires. De plus, le cartilage des bronches donne spontanément une certaine fluorescence en lumière ultra-violette. Le matériel pulmonaire est donc peu indiqué pour notre étude et a été écarté.

Il faut enfin signaler que les coupes de vaisseaux prélevées chez des rats normaux peuvent présenter une légère auto-fluorescence bleutée, et non verte, au niveau des fibres élastiques.

b) Animaux traités.

1) **Par l'acide ε -aminocaproïque.** — Sur les coupes de rein prélevé chez des rats ayant reçu de l'acide ε -aminocaproïque pendant 20 ou 30 jours, et mises en contact de sérum anti-fibrinogène marqué, on décèle, dans les artères rénales, deux couches fluorescentes ; l'une, intense, paraît se situer sous l'intima, dans la limitante élastique interne ; la seconde, plus faible, se trouve dans l'adventice (fig. 22 et 23).

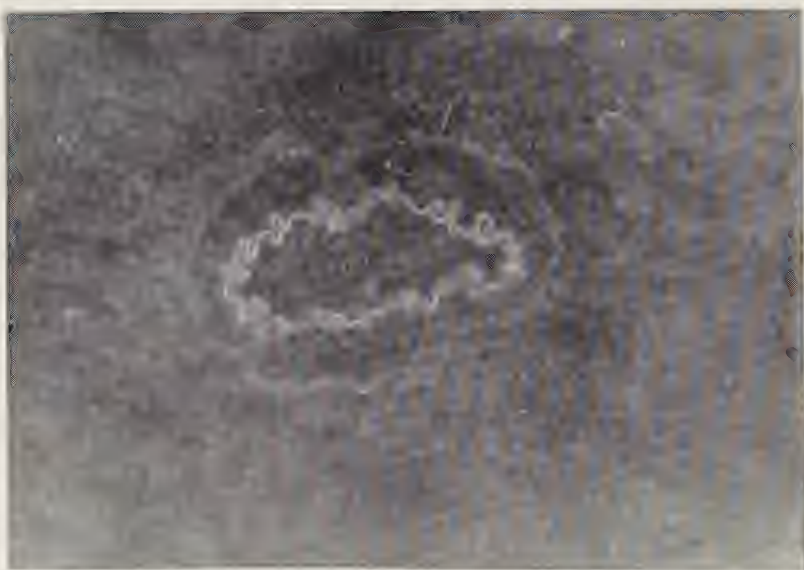


FIG. 22 et 23. Coupe de vaisseau de rein, prélevé chez un rat, traité pendant 20 jours par de l'acide ϵ -aminocaproïque, mise en contact de sérum anti-fibrinogène de rat marqué à la fluorescéine. L'examen est réalisé au microscope à contraste de phase, en lumière visible (fig. 22) et en lumière ultra-violette (fig. 23).

Le traitement des coupes par sérum anti-fibrinogène, suivi du sérum anti- γ -globulines de lapin, marqué à la fluorescéine, donne des résultats identiques.

Par contre, l'application préalable de sérum anti-fibrinogène normal empêche la fixation ultérieure du même anti-sérum conjugué.

Notons enfin que le sérum anti-plaquettes marqué à la fluorescéine ne donne pas de réaction fluorescente avec les coupes de vaisseaux rénaux.

Des résultats semblables à ceux que nous venons d'exposer, sont obtenus sur des coupes de rein prélevé chez les rats injectés d'acide ϵ -aminocaproïque pendant 10 jours. Toutefois, la fluorescence provoquée sur ce matériel par le sérum anti-fibrinogène marqué est nettement moins intense.

Dans les vaisseaux hépatiques, le traitement par l'acide ϵ -aminocaproïque pendant 10, 20 ou 30 jours fait également apparaître du matériel donnant une fluorescence sous l'action du sérum anti-fibrinogène conjugué. Toutefois, la réaction observée est moins manifeste que dans le rein. Les coupes témoins donnent à nouveau des résultats négatifs.

2) **Par l'inhibiteur de KUNITZ.** — Devant les résultats obtenus chez le rat avec l'acide ϵ -aminocaproïque, nous avons recherché l'effet sur la paroi vasculaire de cette anti-plasmine. Chez les 6 rats traités par cette substance à dose élevée, pendant 30 jours, nous n'avons jamais trouvé de matériel fixant le sérum anti-fibrinogène marqué dans ou sur la paroi vasculaire.

3. Discussion.

L'administration prolongée d'acide ϵ -aminocaproïque chez le rat fait apparaître dans les parois vasculaires, particulièrement au niveau du rein mais aussi au niveau du foie, une substance capable de fixer les anticorps anti-fibrinogène. Cette réaction, mise en évidence par l'immunofluorescence, est bien spécifique, comme le montrent les divers témoins réalisés.

Il nous est actuellement impossible de définir la nature exacte de cette substance fixant les anticorps anti-fibrinogène dans la paroi vasculaire. S'agit-il de fibrinogène ou de fibrine ? Nous ne pouvons à présent différencier ces deux substances par les méthodes immunologiques (voir 3^e partie, chapitre 1, page 154).

Il faut rappeler que l'acide ϵ -aminocaproïque est un inhibiteur de l'activation du plasminogène en plasmine. Or le tissu rénal est particulièrement riche en activateur du système fibrinolytique (ASTRUP, 1959). Dans les vaisseaux, cet activateur se situe au niveau de l'adventice. Rappelons que le matériel fluorescent sous l'effet du sérum anti-fibrinogène marqué ne se situe pas sur l'endothélium vasculaire, mais il lui est sous-jacent. Ce dépôt est-il dû à l'inhibition d'une fibrinolyse continue dans la paroi vasculaire ? Cette hypothèse, séduisante certes, nécessite de nouvelles recherches.

Il est étonnant de constater que l'injection prolongée d'un autre inhibiteur de la fibrinolyse, l'inhibiteur de KUNITZ, ne provoque pas l'apparition de ce matériel fibrineux ni dans la paroi des vaisseaux ni à leur surface. On rappellera cependant que cet agent est une anti-plasmine, tandis que l'acide ϵ -aminocaproïque est un anti-activateur du plasminogène. Ces propriétés particulières expliquent peut-être les différences d'action constatées entre l'acide ϵ -aminocaproïque et l'inhibiteur de KUNITZ.

Les observations décrites dans le présent chapitre, bien que d'interprétation délicate, nous semblent être favorables à la théorie de la fibrinolyse continue. Elle pourrait permettre d'attribuer un rôle important à l'activation du système fibrinolytique vasculaire dans la genèse des lésions du purpura thrombopénique.

4. Conclusions.

1) L'administration prolongée d'acide ϵ -aminocaproïque chez le rat provoque l'apparition dans les parois vasculaires, d'une substance ayant les caractéristiques immunochimiques du fibrinogène ou de la fibrine.

2) L'action de cet anti-activateur du système fibrinolytique suggère que ce dernier serait continuellement activé.

CHAPITRE VIII

THROMBOPÉNIE ET FIBRINOLYSE EN PATHOLOGIE HUMAINE

L'observation clinique permet de confirmer certains des résultats expérimentaux observés chez le rat.

S'il existe chez l'homme une relation entre la thrombocytose et la tendance aux saignements, celle-ci est loin d'être constante (ROSKAM, 1956). En effet, dans certaines thrombopénies de type chronique, on ne relève que peu ou même pas de purpura : il en est ainsi dans certaines aplasies médullaires. Par ailleurs, on peut voir apparaître des lésions purpuriques chez les patients ayant un nombre normal de plaquettes qui, toutefois, présentent un comportement aberrant. Il en est ainsi dans la maladie de GLANZMANN, où les plaquettes n'assurent pas la rétraction du caillot.

A la lumière de nos travaux expérimentaux réalisés chez le rat, nous avons recherché s'il existait chez l'homme une relation entre taux des plaquettes, activité fibrinolytique et tendance aux éruptions purpuriques.

1. Matériel et méthodes.

Les patients, objets de notre étude, sont atteints les uns de purpura thrombopénique idiopathique, connu sous le nom de maladie de WERLHOF, d'autres de panmyélophtisie, d'autres encore de leucémie lymphoïde chronique ou d'anémie nécessitant des transfusions répétées. Certains patients, enfin, sont soumis, dans un but thérapeutique, à l'activation de leur système fibrinolytique à l'aide de streptokinase.

La mesure des activités fibrinolytiques est réalisée sur plaque de fibrine selon la technique d'ASTRUP (1^{re} partie, chapitre 2, page 38). Les mesures sont effectuées sur plaques, chauffées ou non, à l'aide du plasma et des euglobulines extraites de ce dernier. Dans nos conditions expérimentales, le plasma de sujets normaux est totalement inactif sur les

plaques de fibrine ; les euglobulines donnent une zone de lyse de 55 mm² sur plaque non chauffée, et de 5 mm² sur plaque chauffée (Tableau XV).

La résistance vasculaire est mesurée selon la technique du brassard, qui consiste à provoquer localement une hypertension veineuse dans des conditions standardisées (ROSKAM, 1929).

Le dénombrement des plaquettes est réalisé selon la méthode de BOUNAMEAUX (1958).

TABLEAU XV

Sujets	Surface lysée par les euglobulines sur	
	plaque normale	plaque chauffée à 80°
n° 1	52	0
2	49	10
3	64	22
4	40	0
5	56	0
6	63	20
7	36	0
8	48	0
9	63	0
10	60	0
Moyenne :	55,1 ± 6,36 *	5,2 ± 5,62 *

Activité fibrinolytique mesurée à l'aide des euglobulines isolées chez 10 hommes normaux. L'étendue des surfaces lysées sur les plaques de fibrine, chauffées ou non, exprimée en mm², correspond à la moyenne de 3 mesures.

* $\pm 2 \sigma_1$.

2. Résultats.

a) Maladie de WERLHOF.

Premier cas : L'étude d'une jeune patiente atteinte de cette maladie et soumise à la splénectomie, nous a permis quelques observations intéressantes (fig. 24) (SALMON, 1962).

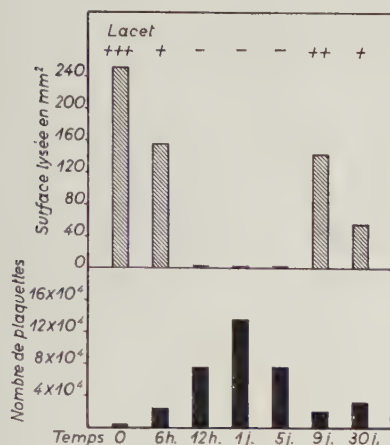


FIG. 24. Taux des plaquettes (par mm^3), activité fibrinolytique (surface lysée sur plaque de fibrine ordinaire) et intensité du signe du brassard (lacet), mesurés avant (temps 0) et à divers moments après splénectomie, dans un cas de maladie de WERLHOF. (1^{er} cas).

Avant l'intervention chirurgicale, le taux des plaquettes est inférieur à 10.000 éléments par mm^3 , les téguments portent de nombreuses pétéchies, le signe du lacet est fortement positif. L'activité fibrinolytique du plasma est nulle, mais celle des euglobulines, mesurée sur plaque non chauffée, est fortement augmentée (la surface lysée est de 252 mm^2).

Six heures après l'opération, le signe du brassard diminue d'intensité, le taux des plaquettes remonte à 23.600 éléments par mm^3 , la surface lysée sur plaque de fibrine normale n'est plus que de 154 mm^2 . Dans les heures et les jours qui suivent, la thrombocytose s'élève à 78.000, puis à 135.000, mais retombe à 70.000 éléments par mm^3 le 5^e jour. Le signe du brassard devient négatif dès la 12^e heure. Il n'y a plus d'activité fibrinolytique décelable sur plaque de fibrine.

Le 9^e jour, les plaquettes sont au nombre de 20.000/ mm^3 , tandis que le signe du brassard redevient positif. A ce moment, l'activité fibrinolytique réapparaît, la surface lysée sur plaque de fibrine non chauffée est de 143 mm^2 . Par la suite, le taux des plaquettes s'élève à nouveau, tandis que les activités fibrinolytiques et le signe du brassard diminuent d'intensité, puis se négativent*.

* Pour des raisons techniques, nous ne possédons pas, dans ce cas, de dosages valables des activités fibrinolytiques mesurées sur plaque chauffée. Toutefois, vu l'intérêt de cette observation, nous avons tenu à présenter le dosage des activités fibrinolytiques globales, c'est-à-dire mesurées sur plaque non chauffée.

Deuxième cas : La seconde malade est âgée de 37 ans. Elle souffre de métrorragies depuis de nombreux mois, mais ne présente pas de purpura spontané.

Le 22 novembre 1962, les plaquettes sont à $2.000/\text{mm}^3$. L'activité fibrinolytique des euglobulines est normale (42 mm^2 sur plaque non chauffée ; nulle sur plaque chauffée). Vu la richesse en mégacaryocytes de la ponction sternale et l'évolution prolongée de la maladie, on pose le diagnostic de purpura thrombopénique idiopathique. Dans les mois suivants, l'état clinique demeure inchangé, on répète les mesures de la thrombocytose et de l'activité fibrinolytique parallèlement à la pratique du signe du lacet qui demeure toujours fortement positif. Les résultats de ces examens successifs sont superposables à ceux des premières épreuves.

Le 24 avril 1963, la patiente, en période menstruelle, présente un peu de purpura spontané. Les plaquettes sont à $24.000/\text{mm}^3$, le signe du brassard est fortement positif, l'activité fibrinolytique du plasma est nulle, celle des euglobulines sur plaque non chauffée est de 161 mm^2 et de 7 mm^2 sur plaque chauffée.

Troisième cas : Il s'agit d'une femme de 21 ans, enceinte de 7 mois, qui présente un important purpura depuis plusieurs jours.

Le 16 janvier 1963, les plaquettes sont au nombre de 18.000 par mm^3 (fig. 25). L'activité fibrinolytique du plasma est nulle, celle des euglo-

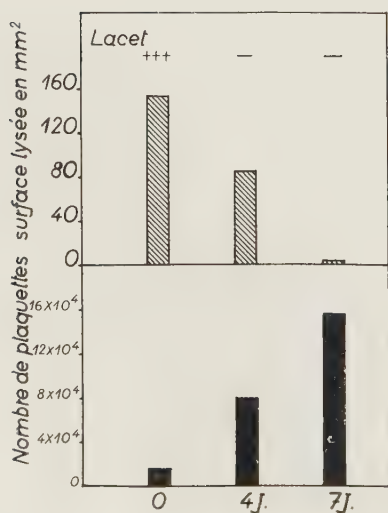


FIG. 25. Taux des plaquettes (par mm^3), activité fibrinolytique (surface lysée sur plaque de fibrine ordinaire) et intensité du signe du brassard (lacet), mesurés avant (temps 0) et sous traitement par corticoïdes chez une malade atteinte de maladie de WERLHOF (3^e cas).

bulines est de 154 mm² sur plaque normale, de 45 mm² sur plaque chauffée. La moelle sternale est riche en mégacaryocytes. Un traitement par prednisolone, à raison de 60 mg/jour, est aussitôt instauré. Quatre jours plus tard, le purpura a entièrement disparu ; le signe du lacet, qui était fortement positif, se négative ; les plaquettes sont à 80.000/mm³. A ce moment, la surface lysée par les euglobulines sur plaque non chauffée est de 85 mm² ; elle est nulle sur plaque chauffée. Cette activité fibrinolytique se négativera les jours suivants, tandis que les plaquettes se stabiliseront à un taux normal. Le signe du lacet persistera négatif.

b) Thrombopénie par aplasie médullaire.

Bon nombre des thrombopénies que nous avons observées, sont secondaires à des aplasies médullaires. On est fréquemment frappé par la discordance existant entre la faible intensité du purpura spontané et l'importance de la thrombopénie. Toutefois, le signe du lacet pratiqué chez ces patients est généralement fortement positif. Quant à l'activité fibrinolytique de leur plasma, elle est nulle. Celle des euglobulines est également très faible (Tableau XVI).

TABLEAU XVI

Patients	Plaquettes	Surface lysée par les euglobulines sur	
		plaque normale	plaque chauffée
FRE.	5.000	63	0
VAN.	6.000	72	17
THON.	32.500	63	0
FRA.	10.000	0	0
BRAW.	25.000	43	0
ROB.	7.500	72	40
REN.	5.000	88	0

Taux des plaquettes et activités fibrinolytiques chez divers patients atteints de panmyéloptisie.

Très souvent, ces malades dont l'anémie exige des transfusions répétées, développent progressivement des réactions post-transfusionnelles qui sont bientôt suivies, selon leur intensité, d'un important purpura généralisé. Les activités fibrinolytiques des euglobulines, mesurées avant et après l'administration de sang, se trouvent fortement augmentées par les transfusions mal tolérées (Tableau XVII). Cette activation de la fibrinolyse précède de quelques heures l'apparition du purpura. Nous pensons qu'elle pourrait faire suite à une réaction antigène-anticorps, provoquée par un phénomène d'iso-immunisation dirigée contre les globules blancs et/ou les plaquettes.

Un malade, atteint d'aplasie médullaire (Tableau XVII, patient G R A), supporte une transfusion sans aucun trouble. Bien que thrombopénique, il ne développe pas de pétéchies. On ne note pas d'activation de son système fibrinolytique. Il n'en est pas de même lors de la transfusion ultérieure qui, suivie d'une hausse thermique et de purpura, s'accompagne d'une activation de la fibrinolyse.

c) Anémie.

Une de nos patientes (Tableau XVII, malade BA.) est transfusée depuis de nombreux mois pour une anémie que provoquent des pertes de sang occultes. Elle développe fréquemment des réactions post-transfusionnelles. Ses plaquettes sont à un taux normal. La transfusion mal tolérée est suivie d'une activation de son système fibrinolytique, comme le montrent les résultats des mesures faites sur plaque non chauffée (132 mm^2), la surface lysée sur plaque chauffée n'étant que peu augmentée par cette transfusion (30 mm^2).

d) Leucémie.

Une de nos patientes, atteinte de leucémie lymphoïde chronique (Tableau XVII, malade DET.), subit régulièrement des transfusions sanguines afin de corriger son anémie. Elle présente spontanément un peu de purpura. Ses activités fibrinolytiques sont d'ailleurs anormalement élevées (156 mm^2 sur plaque non chauffée, 108 mm^2 sur plaque chauffée). A l'occasion d'une transfusion mal tolérée, on note l'apparition de nombreuses pétéchies faisant suite d'ailleurs à une augmentation de l'activité fibrinolytique des euglobulines (285 mm^2 sur plaque non chauffée, 183 mm^2 sur plaque chauffée).

TABLEAU XVII

Patients	Plaquettes	Surface lysée par les euglobulines sur plaque de fibrine				Suites
		Avant transfusion		Après transfusion		
		Plaque		Plaque		
		normale	chauffée	normale	chauffée	
VAN. Aplasie	6.000	72	17	152	108	purpura
GRA. Aplasie	10.000	0	0	0	0	pas de purpura
Même patient	10.000	0	0	169	58	purpura
BA. Anémie	278.000	81	20	132	30	pas de purpura
DET. Leucémie lymphoïde	4.000	156	108	285	183	purpura

Activités fibrinolytiques euglobulines isolées, avant et après administration de sang, chez des patients atteints d'affections sanguines variées, et qui ont été polytransfusés.

Certaines de ces transfusions sont suivies d'éruptions purpuriques.

c) Fibrinolyse thérapeutique.

Nous pratiquons le traitement fibrinolytique dans les affections thrombo-emboliques depuis plus de deux ans (4^e partie, paragraphe 5, page 183). Pour ce faire, nous activons de façon intense le système fibrinolytique de nos patients à l'aide de streptokinase. Malgré l'activité

fibrinolytique importante induite dans le sang circulant, nous n'avons vu apparaître de purpura spontané ou provoqué par le signe du brassard que dans un seul cas. Il s'agissait d'une patiente, atteinte d'embolie fémorale, qui présenta des hémorragies diffuses au niveau des muqueuses, dès le début du traitement. Le signe du brassard, aussitôt provoqué, s'avéra nettement positif. Un examen sanguin révéla une intense thrombopénie à 15.000 éléments par mm³. L'arrêt de la perfusion de streptokinase et l'administration d'acide ϵ -aminocaproïque fut suivie de l'arrêt des hémorragies et de la négativation du signe du brassard.

3. Discussion.

Nos observations cliniques sont en parfait accord avec les résultats expérimentaux obtenus chez le rat. Elles suggèrent, en effet, qu'il existe une relation entre l'apparition des lésions vasculaires et l'activation du système fibrinolytique. A elle seule, la thrombopénie ne provoque pas de lésions pétéchiâles, celles-ci n'apparaissent que lorsqu'il existe en outre une activité fibrinolytique anormale. Cette dernière, à elle seule, est également sans effet, comme le prouvent nos observations lors de l'administration de streptokinase.

Chez les malades polytransfusés, l'activation du système fibrinolytique pourrait faire suite aux réactions antigène-anticorps consécutives aux phénomènes d'iso-immunisation.

Dans la maladie de WERLHOF, cette activation se comprend malaisément. Certains l'attribuent, mais sans preuves, à la thrombopénie elle-même (STEFANINI et MURPHY, 1956). Cette interprétation paraît cependant difficile à retenir, puisque dans certaines aplasies médullaires, avec thrombocytose basse, l'activité fibrinolytique reste normale. De plus, une de nos patientes, atteinte de thrombopénie idiopathique, bien qu'ayant un taux de plaquettes très bas, montrait une activité fibrinolytique faible. Enfin, on connaît l'existence d'une anti-fibrinolysine plaquettaire dont l'intervention est encore mal définie et qui ne peut être ignorée (JOHNSON et SCHNEIDER, 1953).

Il n'est pas sans intérêt de constater que la splénectomie ou la corticothérapie, chez certains de nos patients atteints de la maladie de WERLHOF, ont eu pour effet de négativer le signe du brassard et de normaliser le taux des plaquettes et l'activité fibrinolytique des euglobulines. En effet, cette affection est parfois attribuée à la présence dans l'organisme d'auto-anticorps anti-plaquettes (HARRINGTON et ARIMURA, 1961). Si ce

mécanisme pathogénique était démontré, on comprendrait que la diminution d'intensité de la réponse immunologique, conséquence bien connue des thérapeutiques précitées, ait pour effet bénéfique à la fois un arrêt de la destruction des plaquettes et une abolition du processus d'activation du système fibrinolytique par la réaction antigène-anticorps.

Au cours de nos explorations cliniques, nous utilisons le signe du brassard. Il nous semble que ce test mérite de nouvelles études quant à sa signification. Il est le plus souvent positif en cas de thrombopénie, bien que, chez certains individus dont le taux des plaquettes est très faible, il ne soit pas nécessairement intense (ROSKAM, 1963). On admet que les pétéchies apparaissent par suite de la fragilisation des vaisseaux, mise en évidence par l'hypertension veineuse. Mais il faut rappeler que la stase veineuse active le système fibrinolytique (KWAAN, LO et Mc FADZEAN, 1957), fait que nous avons pu confirmer précisément en pratiquant l'épreuve du brassard. Aussi peut-on à bon droit se demander dans quelle mesure la fibrinolyse est susceptible ou non d'intervenir dans le mécanisme de ce test.

Les interrelations existant entre thrombopénie, activation de la fibrinolyse et tendance aux saignements sont actuellement admises par de nombreux hématologues. C'est ainsi par exemple que REID *et al.* (1962) ont trouvé une fibrinolyse anormale chez les thrombopéniques qui saignent et une activité faible chez ceux qui ne présentent pas d'hémorragie.

Les travaux qui ont développé l'idée de l'intervention du système fibrinolytique dans les complications hémorragiques des thrombopénies, aboutissent logiquement à des applications pratiques. On utilise, dans ces cas, l'acide ϵ -aminocaproïque qui, rappelons-le, est un anti-activateur du plasminogène en plasmine. Notre propre expérience clinique est encore très réduite, mais d'autres auteurs (CATTAN *et al.*, 1963) ont utilisé cette substance avec des succès très prometteurs. Il est cependant trop tôt pour se prononcer sur la valeur thérapeutique de cet agent. Nous pensons que son rôle doit être surtout de prévenir l'activation du système fibrinolytique lorsqu'on peut la soupçonner, par exemple chez les polytransfusés. Mais, vu la pluralité des facteurs conduisant aux saignements, il serait illusoire d'espérer l'arrêt des hémorragies chez des sujets thrombopéniques par action sur un seul de ces facteurs. L'acide ϵ -aminocaproïque, susceptible de corriger le facteur vasculaire, sera donc l'un des éléments d'une thérapeutique complexe.

4. Conclusions.

1) La seule thrombopénie ne peut expliquer, chez l'homme, l'apparition du purpura.

2) L'activation du système fibrinolytique dans le torrent circulatoire de l'homme n'est pas suivie de lésions pétéchiâles.

3) L'association d'une thrombopénie et d'une activation de la fibrinolyse est susceptible d'induire du purpura.

4) La tendance purpurigène, souvent observée en cas de thrombopénie, est liée à l'activité fibrinolytique qui lui est fréquemment associée.

5) La plasmine pourrait donc être un des médiateurs provoquant les lésions vasculaires nécessaires à l'apparition des pétéchiâs dans les thrombopénies humaines.

6) Les substances anti-fibrinolytiques, tel l'acide ϵ -aminocaproïque, peuvent jouer un rôle dans la thérapeutique des purpuras thrombopéniques en prévenant la genèse des lésions vasculaires.

CONCLUSIONS

de la deuxième partie

Nous ne reprendrons pas ici les diverses conclusions exposées à la fin de chaque chapitre, auxquelles nous renvoyons le lecteur. Nous rassemblerons dans ces lignes les divers enseignements découlant de nos résultats expérimentaux et de nos observations en clinique humaine.

1. L'étude des antigènes plaquettaires de l'homme et d'autres mammifères montre que les thrombocytes fixent, de façon très ferme, de nombreuses protéines plasmatiques et, en particulier, le fibrinogène. Bien connue pour certains facteurs de coagulation cette propriété se manifeste aussi pour des protéines pathologiques comme celles du myélome et de la macroglobulinémie, expliquant ainsi certains troubles de l'hémostase rencontrés dans ces affections. Ce phénomène est exprimé dans le titre d'une revue d'ADELSON *et al.* (1961) : « **Platelets as a sponge** ».

2. Les protéines plasmatiques variées présentes dans les thrombocytes abondamment lavés suscitent la formation d'anticorps homologues par l'animal injecté de plaquettes. Il est donc indispensable de les éliminer des sérums anti-plaquettes dont on désire étudier les effets pathogènes strictement spécifiques. Cette remarque s'applique d'ailleurs à d'autres anti-sérums, tels les sérums anti-vasseaux.

3. La double pathogénie du purpura thrombopénique immunologique, à la fois plaquettaire et vasculaire, ne peut s'expliquer par l'existence d'antigènes spécifiques, communs aux plaquettes et aux vaisseaux. En effet, quelles que soient les techniques utilisées : précipitation en gélose, analyse imm.électr., épreuve d'agglutination plaquettaire, immunofluorescence, il ne nous a pas été possible de découvrir du matériel plaquettaire au niveau des vaisseaux. On ne peut donc concevoir qu'il existe sur l'endothélium vasculaire une couche de plaquettes qui serait responsable de son intégrité. D'autre part, on ne peut davantage admettre que les plaquettes soient utilisées pour réparer les multiples brèches qui, selon certains, se produiraient de façon continue dans les parois vasculaires normales.

4. L'étude du purpura thrombopénique immunologique, induit expérimentalement chez le rat, suggère que l'injection du sérum anti-plaquettes provoque, en plus de la thrombopénie, les lésions vasculaires nécessaires à l'apparition des pétéchies. Ces altérations seraient la conséquence de la réaction antigène-anticorps se déroulant *in vivo*. Cette réaction peut activer des enzymes protéolytiques ou, plus particulièrement, fibrinolytiques, qui provoqueraient alors les ruptures vasculaires permettant les suffusions sanguines. Cette hypothèse est confirmée par l'étude des effets de l'acide ϵ -aminocaproïque sur l'apparition de purpura. Cet acide aminé, qui entrave la transformation du plasminogène en plasmine, inhibe également l'action purpurigène du sérum anti-plaquettes sans s'opposer à son action thrombopénisante.

5. Chez des rats rendus thrombopéniques par le phosphore radioactif et ne présentant pas de purpura, il est possible d'induire des lésions vasculaires nécessaires à la genèse des pétéchies, en activant le système fibrinolytique à l'aide de streptokinase et de plasma humain ou en provoquant une réaction antigène-anticorps dans le sang circulant.

6. La production des lésions vasculaires dans le purpura thrombopénique immunologique paraît nécessiter l'intervention du complément, car la réduction du taux de ce dernier, avant l'injection de sérum anti-plaquettes, empêche l'apparition du purpura, mais non la chute du taux des thrombocytes.

La fixation du complément par le complexe antigène-anticorps, *in vivo*, pourrait donc être la première étape des phénomènes aboutissant à la lésion vasculaire.

7. Le lieu et le mode d'action des enzymes protéolytiques responsables des lésions vasculaires, doivent encore être précisés.

S'il n'a pas été possible de démontrer la présence de fibrine sur l'endothélium ou dans les parois de vaisseaux normaux, l'administration prolongée d'acide ϵ -aminocaproïque au rat permet d'observer l'accumulation, dans les parois vasculaires, d'un matériel ayant les caractéristiques antigéniques du fibrinogène ou de la fibrine. Cette observation est en bon accord avec l'hypothèse d'un équilibre dynamique entre coagulation et fibrinolyse continues.

8. L'observation en clinique humaine permet de confirmer certains des résultats obtenus lors de l'expérimentation animale. A elles seules, ni la diminution du taux des plaquettes ni l'activité du système fibrinolytique

ne peuvent expliquer l'apparition du purpura thrombopénique. Lorsque ces deux facteurs sont associés, les pétéchie apparaissent et leur abondance est fonction directe de l'activité fibrinolytique du plasma.

9. Les résultats cliniques et expérimentaux justifient l'emploi de l'acide ϵ -aminocaproïque pour la prévention des hémorragies chez des patients thrombopéniques.

TROISIÈME PARTIE

APPLICATION DES TECHNIQUES
IMMUNOLOGIQUES A L'ÉTUDE
DU SYSTÈME FIBRINOLYTIQUE

INTRODUCTION

L'intervention de la plasmine dans la genèse des altérations vasculaires rencontrées dans le purpura thrombopénique, est un aspect nouveau de la pathologie du système fibrinolytique.

Nos connaissances dans ce domaine sont récentes et encore très incomplètes. Il nous a donc paru utile de les résumer ici, afin de mieux comprendre la signification biologique de nos résultats et pour intégrer nos propres recherches dans la vaste littérature consacrée aux accidents fibrinolytiques.

Nous rappellerons en premier lieu ce que nous connaissons du rôle physiologique du système fibrinolytique, puis décrirons brièvement les divers mécanismes qui peuvent induire une activité fibrinolytique anormale.

1. Fibrinolyse et coagulation continues.

Selon certains auteurs (FEARNLEY et TWEED, 1953 ; SAWYER *et al.*, 1960), il existe dans le sang humain normal une certaine activité fibrinolytique. Rappelons qu'un caillot, incubé dans des conditions aseptiques, se dissout spontanément après une période prolongée de 48 heures et davantage. La dilution du sang comme la formation du caillot à partir des euglobulines plasmatiques accélèrent cette dissolution. L'activateur du plasminogène existe donc à l'état libre dans la circulation. C'est sur ces constatations que s'appuie la théorie d'ASTRUP (1958) selon laquelle il existerait, dans le torrent circulatoire, un équilibre entre une coagulation et une fibrinolyse continues, appelé « balance hémostatique ». Toutefois, cette hypothèse très séduisante est loin d'être prouvée (HJÖRT et HASSELBACK, 1961). Cependant, nos observations (3^e partie, chapitre II, page 163) suggèrent l'existence d'une dégradation permanente du fibrinogène ou de la fibrine dans le sang humain. Si nous n'avons pu montrer de fibrine dans les vaisseaux à l'état normal, il est toutefois établi qu'une substance ayant les propriétés antéfébriles du fibrinogène ou de la fibrine s'y accumule sous l'influence d'injections répétées d'un

inhibiteur du système fibrinolytique, l'acide ϵ -aminocaproïque (voir 2^e partie, chapitre VII, page 121).

Comme toute protéine plasmatique, le fibrinogène est soumis à un « turnover ». Il est possible que son catabolisme se réalise soit directement, soit après sa transformation préalable en fibrine.

2. Activation du système fibrinolytique.

Chez l'homme sain, l'activité fibrinolytique peut se trouver accrue sous les influences les plus diverses, sans s'accompagner nécessairement d'une augmentation de la plasmine. En effet, selon SHERRY *et al.* (1959), la fibrinolysine libérée dans la circulation sous l'action d'un activateur du plasminogène serait immédiatement neutralisée par les anti-plasmines hautement efficaces. Dans le caillot, qui est riche en plasminogène et pauvre en inhibiteur, les phénomènes se déroulent de façon différente : la plasmine formée localement par l'activateur qui y diffuse, ne serait pas inhibée. Ainsi s'expliquerait le fait que la fibrinolysine, enzyme protéolytique à spectre large, ne s'attaque, dans les conditions physiologiques, qu'à la seule fibrine. La spécificité de l'action effective de cet enzyme serait fonction du jeu des inhibiteurs de la fibrinolyse.

L'activation du système fibrinolytique est observée après des exercices violents ou des stress variés, tel celui qui accompagne la perspective d'une intervention chirurgicale (MACFARLANE et BIGGS, 1946). L'injection d'adrénaline accentue également l'activité fibrinolytique (BIGGS *et al.*, 1947). Cette substance serait d'ailleurs le médiateur de l'activation dans les états précités. Les électrochocs provoquent également l'activation de la fibrinolyse : un mécanisme nerveux pourrait intervenir dans les phénomènes d'activation (FANTL et SIMON, 1948).

Citons encore la libération d'activateur sous l'effet de l'anoxémie (TAGNON *et al.*, 1946), de l'ischémie locale (KWAAN et MC FADZEAN, 1956), après injection de lipopolysaccharides bactériens (EICHENBERGER *et al.*, 1955 ; VON KAULA, 1958) et de certains médicaments, tel l'acide nicotinique (WEINER *et al.*).

Selon les travaux de KWAAN, LO et MC FADZEAN (1957), l'ischémie des *vasa vasorum* provoquerait secondairement une décharge d'activateur à partir des parois vasculaires. Signalons à ce propos que nos propres observations cliniques nous ont permis de constater des fibrinolyse spontanées chez des patients atteints d'embolies artérielles ou de thrombose coronaire. Cette activation de courte durée semble secondaire à une ischémie brutale.

Chez la femme, il existe des variations du fibrinogène, du plasminogène et des anti-fibrinolytines en relation avec le cycle menstruel (TURKSOY *et al.*, 1961). On note une activation du système fibrinolytique au moment des règles, lorsque le taux des œstrogènes s'effondre. Ce phénomène disparaissant dès la ménopause, certains auteurs voient là l'explication de la plus grande tendance à la thrombose chez la femme dès cette époque. Il semble donc exister une relation étroite entre l'activité fibrinolytique et les sécrétions d'hormones sexuelles. Plaident d'ailleurs dans ce sens certaines de nos observations : chez trois patients atteints d'accident fibrinolytique aigu, l'administration intra-veineuse de succinate d'oestriol (ORGANON), à raison de 3×10 mg/jour, réduit de façon spectaculaire le taux d'activateur du plasminogène, dans le torrent sanguin.

3. Système fibrinolytique tissulaire.

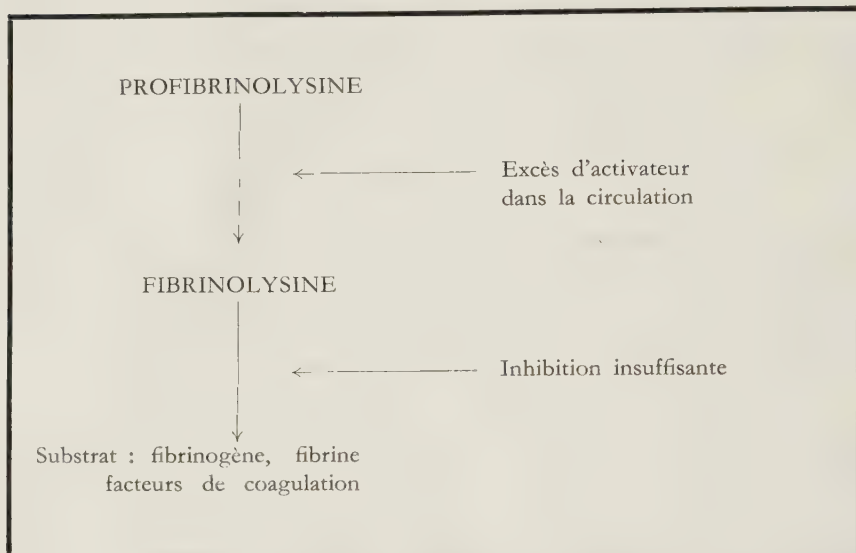
Le rôle que joue le système fibrinolytique tissulaire semble primordial dans la pathogénie de l'inflammation (ASTRUP, 1959). S'il intervient en premier lieu dans la résorption des dépôts fibrineux, peut-être permet-il en plus la libération, dans le foyer inflammatoire, de certains polypeptides à action vasomotrice du type de la bradykinine (SALMON et LECOMTE, 1963 b). Il a d'ailleurs été démontré que les agents anti-fibrinolytiques comme l'acide ε -aminocaproïque possèdent parfois une action anti-inflammatoire (ZWEIFACH *et al.*, 1961 ; LEFEBVRE *et al.*, 1962.)

La présence de taux élevés d'activateur tissulaire dans certains organes permet d'expliquer l'activation de la fibrinolyse lors des interventions chirurgicales touchant ces derniers. Des accidents fibrinolytiques se rencontrent lors d'opérations sur le poumon, la prostate, la rate, qui sont des organes riches en activateurs. D'autre part, certaines néoplasies développées aux dépens de ces tissus peuvent libérer l'activateur dans la circulation à la faveur du contact étroit entre le tissu malade et les lumières vasculaires. Chez les malades atteints de cirrhose du foie, l'activation de la fibrinolyse qui complique parfois cet état pourrait trouver son origine dans la richesse en activateur, du tissu conjonctif néoformé, hautement vascularisé (ASTRUP *et al.*, 1960).

4. Pathogénie des accidents fibrinolytiques (Tableau XVIII).

L'augmentation de plasmine circulante survient lorsque la vitesse d'activation du plasminogène dépasse les possibilités d'inhibition

TABLEAU XVIII



Pathogénie des accidents fibrinolytiques

sanguine. De tels états se rencontrent après déversement brutal d'activateur dans la circulation : lors de certaines interventions chirurgicales, en cas de *shock*, ou d'anoxémie brutale, à l'occasion des manifestations anaphylactiques, phénomène qui a été largement développé dans la seconde partie de ce travail.

La diminution du taux des anti-plasmines peut également favoriser les accidents fibrinolytiques. Ceux-ci seront cependant moins dramatiques que ceux provoqués par la libération d'activateur dans la circulation. Semblable situation peut survenir en présence d'une insuffisance hépatique sévère, par défaut de synthèse des anti-fibrinolysines ou en cas d'intense thrombopénie avec chute secondaire de l'anti-fibrinolysine plaquettaire. Cette dernière pathogénie pourrait expliquer le syndrome hémorragique rencontré dans certaines leucoses (STEFANINI et MURPHY, 1956). Les recherches exposées dans la seconde partie de ce travail nous ont d'ailleurs montré que la fibrinolysine paraît bien être un des médiateurs des lésions vasculaires apparaissant dans le purpura thrombopénique, clinique ou expérimental. L'activité fibrinolytique exagérée rencontrée dans ce syndrome pourrait s'expliquer de deux façons : par défaut de l'anti-fibrinolysine plaquettaire et, dans certains cas rele-

vant d'une pathogénie immunologique, par une libération d'activateur dans la circulation.

On considère actuellement que l'activation du système fibrinolytique pourrait faire suite à une coagulation intra-vasculaire, elle-même provoquée par la résorption d'un matériel thromboplastique dans la circulation. Cette pathogénie, qui peut certes expliquer les accidents observés après embolie de liquide amniotique (STAMM, 1962), semble pouvoir être appliquée à d'autres accidents fibrinolytiques. Les accidents provoqués par une incompatibilité transfusionnelle comme ceux rencontrés dans le phénomène de SHWARTZMAN pourraient relever de cette même pathogénie (LASCH, 1963).

La gravité du syndrome qu'induit l'hyperplasminémie lorsque les mécanismes hémostatiques sont dépassés, s'explique par la polyvalence de l'enzyme. En effet, en plus de la fibrine, il peut dégrader le fibrinogène, le facteur V ou proaccélérine, le facteur VIII ou globuline anti-hémophilique. Le désordre le plus grave semble provoqué par la libération, à partir du fibrinogène et de la fibrine, de certaines substances jouant le rôle d'antithrombine (NIEWIAROWSKI et KOWALSKI, 1958). En réalité, ces dernières interviennent en inhibant la polymérisation des monomères de fibrine aggravant ainsi les conséquences de la dégradation des facteurs de coagulation.

Les divers accidents fibrinolytiques peuvent donc relever d'une pathogénie très différente. Les facteurs déclenchants sont multiples et agissent aux divers niveaux du système fibrinolytique.

Devant cette pluralité pathogénique des accidents fibrinolytiques, il est indispensable de développer nos connaissances physio-pathologiques dans le domaine de la fibrinolyse afin d'entreprendre une thérapeutique logique et efficace des désordres provoqués par son activation.

Si la simple activation du système fibrinolytique implique l'administration d'acide ϵ -aminocaproïque ou d'agents ayant une action anti-plasmine comme l'inhibiteur de FREY ou celui de KUNITZ, les accidents faisant suite à une coagulation intravasculaire pourraient relever d'une thérapeutique par l'héparine (LASCH, 1963).

Résumé

1. Le rôle physiologique du système fibrinolytique demeure énigmatique malgré l'abondante littérature qui lui est consacrée. Divers éléments suggèrent cependant qu'il serait perpétuellement activé.

2. La pathogénie des accidents fibrinolytiques est complexe. Divers facteurs interviennent dans la production de ces désordres dont l'expression clinique, très variée, dépend de la nature des agents déclenchants.

3. L'activité fibrinolytique anormale rencontrée dans certaines thrombopénies constitue un nouvel aspect de la fibrinolyse pathologique.

L'étude des antigènes plaquettaires, exposée dans la 2^e partie de ce travail, nous a conduit à préparer des sérums anti-fibrinogène. Ces immunsérums ont également été utilisés pour la recherche de fibrine ou de fibrinogène dans les parois vasculaires, à l'aide des techniques d'immunofluorescence. Le contrôle indispensable de la spécificité de nos anti-sérums par immunoélectrophorèse et précipitation en gélose, nous a naturellement mené à l'étude immunochimique du fibrinogène et de ses dérivés. Nous avons de la sorte abordé, par de nouvelles techniques, le problème de la fibrinolyse et de la fibrinogénolyse.

CHAPITRE I

ÉTUDE IMMUNOCHIMIQUE DU FIBRINOGENÈ ET DE SES DÉRIVÉS

LE développement récent des techniques immuno-chimiques, telles que la précipitation en gélose et l'analyse imm.électr., ont permis de reconnaître, chose que soupçonnait déjà LANDSTEINER (1945), la présence d'une mosaïque de déterminants antigéniques dans une seule molécule de protéine. Ainsi, fragmentant l'albumine humaine au moyen d'enzymes protéolytiques extraits de rate de lapin, LAPRESLE (1955, 1958) a pu identifier trois fractions différant entre elles, tant par leur mobilité électrophorétique que par leurs propriétés antigéniques.

D'autres chercheurs, tels SCHEIDEGGER et BUZZI (1957), ont mis en évidence plusieurs groupements déterminants antigéniques sur les γ -globulines humaines. Notons que ces auteurs utilisent non pas la scission enzymatique *in vitro* du substrat protéique, mais des fragments naturels, pathologiques, de γ -globulines sous la forme de protéines sériques myélomateuses. A la suite de ces travaux fondamentaux, de nombreux chercheurs se sont attachés à l'étude des motifs antigéniques des γ -globulines.

Nous basant sur ces études, nous avons tenté d'identifier les motifs antigéniques du fibrinogène et de la fibrine, espérant mettre ainsi en évidence une modification de la structure antigénique parallèle aux altérations chimiques (SALMON, 1959, 1961). On sait en effet que sous l'action protéolytique de la thrombine, le fibrinogène libère des polypeptides appelés fibrinopeptides (LAKI *et al.*, 1958), étape préliminaire à la polymérisation des monomères de fibrine et à la formation du caillot. Le but final de nos recherches était de différencier par l'immuno-chimie, le fibrinogène de la fibrine et de déterminer le rôle éventuel joué par celle-ci dans la structure vasculaire.

Cette étude immuno-chimique nous a naturellement mené à étudier la dégradation du fibrinogène et de la fibrine par les techniques immuno-

logiques et à appliquer les résultats de nos recherches à la clinique humaine.

1. Matériel et méthodes.

a) Fibrinogène.

Nous avons utilisé du fibrinogène humain, soit en milieu plasmatique, soit préparé selon la méthode de FLORKIN (1930), soit sous forme de fraction I de COHN, soit enfin purifié selon la méthode de B. et M. BLOMBACK (1956) jusqu'au stade 1-2. Rappelons qu'il s'agit d'une extraction de la fraction I de COHN au moyen de mélanges de glycine, de citrate et d'éthanol. D'après ces auteurs, cette fraction ne contiendrait plus de prothrombine, mais renfermerait encore 20 % du plasminogène et du proactivateur de ce dernier. Dans notre solution finale, 95 % du matériel protéique sont coagulables sous l'action de la thrombine.

b) Fibrine.

Celle-ci est obtenue en traitant la préparation de fibrinogène par une solution de thrombine (Topostasine ROCHE), à raison de 10 unités/ml de la solution de fibrinogène, soit en milieu plasmatique, soit en solution de NaCl à 0,85 % tamponnée à pH 7,4 par les phosphates de SÖRENSEN. La concentration du fibrinogène en solution varie de 1 à 5 g/litre.

La polymérisation des monomères de fibrine est inhibée en solution d'urée à 30 % (LAKI et LORAND, 1948) ou en solution M de NaBr à pH 5,3 (DONNELLY *et al.*, 1955). Nos études immunochimiques étant réalisées en gélose, nous n'avons pu utiliser les effets inhibiteurs de l'urée qui ne peut être introduite à la concentration nécessaire dans un gel d'agar. Nous avons alors comparé les structures antigéniques du fibrinogène et de la fibrine sous forme de monomères, en solution M de NaBr gélifiée par 1,5 % d'agar.

c) Produits de la fibrinolyse et de la fibrinogénolyse.

Ceux-ci ont été obtenus *in vitro* sous l'action de la streptokinase. On sait, en effet, que cet enzyme bactérien, produit par des streptocoques β -hémolytiques, est capable de transformer, chez l'homme, un proactivateur en activateur du plasminogène. Sous son influence, le plasminogène ou profibrinolysine est transformé en plasmine ou fibrinolysine, enzyme protéolytique qui scinde la fibrine et le fibrinogène en

polypeptides. Pour la plupart de nos essais, nous avons utilisé la varidase LEDERLE, préparation commerciale associant la streptokinase (100.000 unités) à la streptodornase (25.000 unités) (*). Nous avons toutefois vérifié nos observations à l'aide d'une préparation de streptokinase purifiée (Kinalysin MERCK) totalement exempte de streptodornase.

Les produits de fibrinogénolyse sont obtenus par addition de streptokinase (10 à 100 unités/ml) à la solution de fibrinogène, qui est ensuite incubée à 37° généralement pendant 6 heures, mais éventuellement pendant des délais variés.

Les produits de fibrinolyse sont obtenus de la même façon, après coagulation préalable du fibrinogène par la thrombine, à raison de 10 unités/ml de solution.

La dégradation du fibrinogène ou de la fibrine est arrêtée par addition d'inhibiteur du soja dissous en tampon phosphate 0,005 M à pH 7,6, à raison de 600 µg/ml de solution.

d) Anti-sérums.

1°) Sérum anti-fibrinogène humain. — Il est induit à l'aide de la fraction I de COHN. Sa préparation a été décrite antérieurement (2^e partie, chapitre I, page 51). Cet anti-sérum renferme des anticorps dirigés contre diverses protéines plasmatiques, qui ont été précipités et éliminés par traitement avec du plasma provenant d'un patient atteint d'afibrinogénémie congénitale **. Après séjour de 2 heures à 37°, le mélange a été incubé à 4° pendant 18 heures et le précipité écarté par centrifugation. Le sérum purifié a été soumis aux épreuves de précipitation en milieu liquide et en milieu gélosé, afin de contrôler sa spécificité pour le fibrinogène.

2°) Sérum anti-fibrine. — Une solution de fraction I renfermant 5 g de fibrinogène par litre a été coagulée par la thrombine. Le caillot obtenu est lavé 4 fois en solution aq. de NaCl à 0,85 %. Après dessiccation, il est broyé au mortier. Le matériel obtenu est alors suspendu en soluté physiologique. Cette préparation, qui renferme l'équivalent de 5 g de fibrinogène par litre, a été injectée à 3 lapins, par voie sous-cutanée, à l'aide d'une grosse aiguille. Le schéma d'immunisation est le suivant : $2 \times 0,5$ ml la première semaine ; 2×1 ml, la deuxième ;

(*) Désoxyribonucléase d'origine streptococcique, qui n'intervient pas dans les phénomènes étudiés.

(**) Plasma que nous devons à l'obligeance du Dr. M. VERSTRAETE.

2 $\times$ 1,5 ml, la troisième ; 2 $\times$ 2 ml, la quatrième. Les animaux sont saignés le 12^e jour après la dernière injection. Les sérums obtenus renfermant divers anticorps anti-protéines sériques, ceux-ci ont été précipités par l'addition de plasma provenant d'un malade atteint d'afibrinogénémie congénitale.

3^o) Sérum anti-produits de fibrinolyse. — A une solution de fraction I de COHN renfermant 5 g de fibrinogène par litre, on ajoute 10 unités de thrombine par ml. Après 30 minutes, le caillot est soumis à la fibrinolyse sous l'action de 500 unités de strèptokinase par ml. Après 18 heures d'incubation à 37°, le caillot est complètement dissous ; on ajoute à la préparation de l'alun de potassium de façon à obtenir une concentration finale de 1 %. La solution est alors exactement neutralisée par une solution de soude concentrée. Il se forme ainsi un gel d'alumine qui emprisonne les produits de fibrinolyse. Cette préparation est injectée par voie intra-veineuse à 2 lapins, à raison de 4 $\times$ 0,5 ml la première semaine ; 4 $\times$ 1 ml, la deuxième ; 4 $\times$ 1,5 ml, la troisième ; 4 $\times$ 2 ml, la quatrième. Les animaux sont saignés le 12^e jour après la dernière injection. Les sérums ainsi obtenus, riches en anticorps anti-protéines sériques, ont également été traités par du plasma afibrinogénémique selon les modalités décrites plus haut.

e) Techniques immunochimiques.

Nous avons utilisé l'analyse imm.électr. et la double diffusion en gélose, toutes deux en micro-méthode selon les modalités décrites par SCHEIDEGGER (1955, 1957) (voir 2^e partie, chapitre I, pages 52 et 53).

2. Résultats.

a) Etude du fibrinogène.

Qu'il soit utilisé en milieu plasmatique ou sous forme purifiée, le fibrinogène humain est précipité en milieu gélifié par le sérum anti-fibrinogène, le sérum anti-fibrine et le sérum anti-produits de fibrinolyse. Ces trois immunosérums précipitent une même substance, car les lignes de précipitation fusionnent parfaitement (fig. 26).

Soumis à l'analyse imm.électr., puis révélé par chacun de ces trois immunosérums, le fibrinogène donne naissance dans chaque cas à une ligne de précipitation arciforme qui se trouve face au réservoir de départ ou légèrement déplacée vers le pôle négatif (fig. 27). Lorsque la

préparation de fibrinogène a séjourné pendant une période prolongée à la température de la chambre, on note un allongement du trait de précipitation vers la cathode (fig. 28).

La substance précipitée est bien le fibrinogène. En effet, elle est absente du plasma d'un sujet atteint d'afibrinogénémie congénitale,

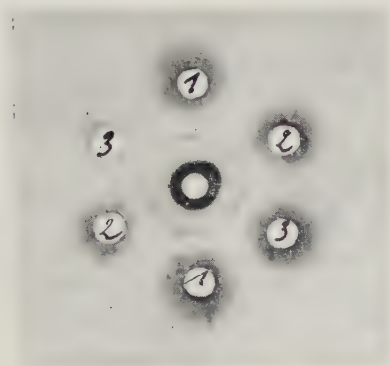


FIG. 26. Précipitation en gélose du fibrinogène (au centre) sous l'action des sérums anti-fibrinogène (1), anti-fibrine (2) et anti-produits de fibrinolyse (3), utilisés à 2 concentrations différentes.

Noter la fusion des traits de précipitation.

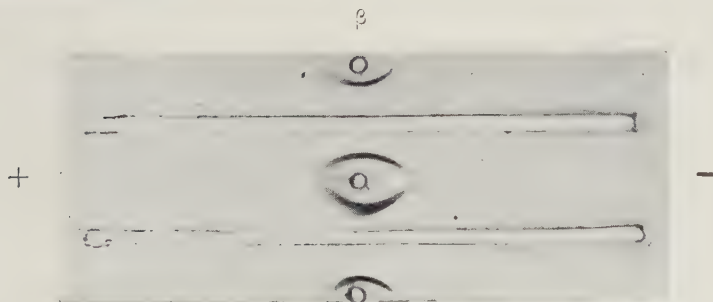


FIG. 27. Analyse immunoélectrophorétique d'une solution fraîche de fibrinogène humain, à l'aide du sérum anti-fibrinogène humain.



FIG. 28. Analyse immunoélectrophorétique d'une préparation vieillie de fibrinogène humain, à l'aide du sérum anti-fibrinogène humain.

Noter, par rapport à la figure 27, le déplacement du trait de précipitation vers le pôle négatif (à droite).

elle est détruite par un chauffage de 3 minutes à 56°, elle disparaît sous l'action de la thrombine.

b) Etude comparée du fibrinogène et de la fibrine.

Le but primitif de ce travail étant de mettre en évidence une différence immuno-chimique entre fibrinogène et fibrine, nous avons en premier lieu essayé d'absorber les anticorps de notre sérum anti-fibrinogène à l'aide de fibrine dispersée dans un gel d'agar (1959). Ces essais n'ont donné que des résultats négatifs. Nous en avons conclu que les groupements déterminatifs antigéniques du fibrinogène, bien que présents dans la fibrine, sont toutefois masqués lors de sa polymérisation.

Afin de comparer les motifs antigéniques du fibrinogène et de la fibrine, nous avons profité de la propriété qu'a la fibrine de rester à l'état de monomère soluble en NaBr M. Dans un gel renfermant cette solution saline, la précipitation du fibrinogène et celle des monomères de fibrine par le sérum anti-fibrinogène se traduisent par deux lignes qui fusionnent parfaitement. Les deux substances paraissent antigéniquement identiques dans ces conditions.

c) Etude immuno-chimique de la dégradation du fibrinogène et de la fibrine.

Afin d'identifier les déterminants antigéniques du fibrinogène et de la fibrine, nous en avons étudié les produits de dégradation par les méthodes utilisant la précipitation en gélose.

1°) Dégradation en milieu plasmatique.

Double diffusion en gélose. — La fibrine, solubilisée sous l'action de la streptokinase agissant pendant 6 heures, donne, en présence du sérum anti-fibrinogène, un trait de précipitation. Il en est de même des produits de fibrinogénolyse. Si, dans un même essai (fig. 29), on fait agir le sérum anti-fibrinogène sur le fibrinogène, sur les produits de la fibrinolyse et sur ceux de la fibrinogénolyse, placés dans les cuvettes adjacentes, on constate que les produits de fibrinolyse ne donnent qu'une image d'identité partielle avec le fibrinogène et les produits de fibrinogénolyse. Ces derniers, par contre, donnent un trait de précipitation qui s'interpénètre parfaitement avec celui du fibrinogène.

Les produits de fibrinolyse semblent donc avoir perdu au moins un des déterminants antigéniques présents dans le fibrinogène et qui est toutefois conservé dans les produits de dégradation de ce dernier.

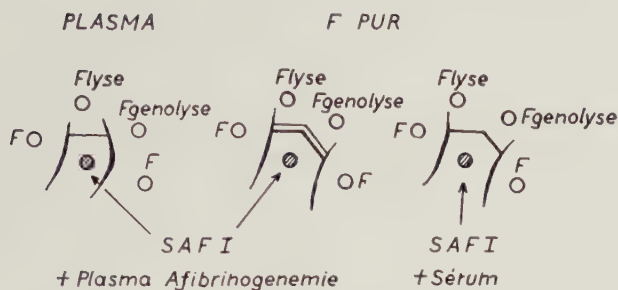


FIG. 29. Représentation schématique des résultats obtenus, lors de la précipitation en gélose du fibrinogène (F), des produits de fibrinolyse (Flyse) et de ceux de fibrinogénolyse (Fgénolyse) obtenus à partir de plasma ou de fibrinogène purifié, sous l'action du sérum anti-fraction I de COHN (SAFI) traité par du plasma d'un sujet atteint d'afibrinogénémie ou par du sérum humain normal.

Nous nous sommes demandé si le déterminant antigénique ainsi perdu n'était pas porté par l'un des fibrinopeptides que la thrombine détache lors de la transformation du fibrinogène en fibrine. Dans ce but, nous avons concentré, par lyophilisation, le liquide exsudant d'un caillot de fibrine, préparé à partir d'une solution de fraction I de COHN coagulée par la thrombine. Cette préparation, qui doit renfermer les fibrinopeptides, n'est précipitée par le sérum anti-fibrinogène ni en milieu liquide ni en gélose, quels que soient les rapports de concentration utilisés. D'autre part, ajoutée en proportions variées à cet immunosérum, elle n'inhibe pas la réaction d'identité partielle observée entre fibrinogène et produits de fibrinolyse. Enfin, solubilisée à des concentrations variées dans le gel d'agar utilisé pour la double diffusion en gélose, elle ne modifie nullement l'image que donnent le fibrinogène et les produits de fibrinolyse sous l'action du sérum anti-fibrinogène.

Les résultats négatifs de ces essais permettent d'écarter l'hypothèse envisagée, d'autant plus qu'il n'existe d'ailleurs pas de différence antigénique entre le fibrinogène et la fibrine sous forme de monomères.

Notons enfin que le sérum anti-fibrine comme le sérum anti-produits de fibrinolyse donnent, avec le fibrinogène et les produits de fibrinolyse ou les produits de fibrinogénolyse, des lignes de précipitation qui fusionnent parfaitement, formant ainsi une image d'identité antigénique entre ces substances.

Analyse immunoélectrophorétique. — Soumis à cet examen et précipités soit par le sérum anti-fibrinogène, soit par le sérum anti-fibrine, soit encore par le sérum anti-produits de fibrinolyse, les produits de la fibrinolyse comme ceux de la fibrinogénolyse, obtenus après au moins 6 heures d'incubation en présence de streptokinase, donnent les uns et les autres naissance à un trait de précipitation fourchu dont l'ouverture est située vers la cathode (fig. 30). Dans les deux cas, les substances précipitées ont une mobilité électrophorétique de β -globulines. Toutefois les images observées ne sont pas identiques.

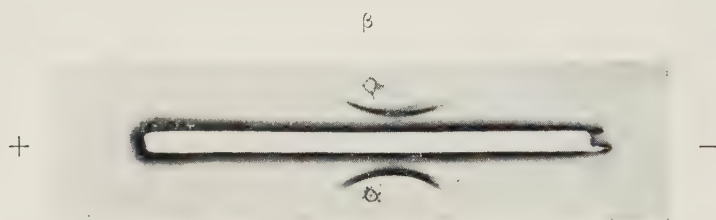


FIG. 30. Analyse immunoélectrophorétique des produits de fibrinolyse (en haut) et de ceux de fibrinogénolyse (en bas) obtenus à partir de plasma humain et précipités par du sérum anti-fraction I de COHN traité par du plasma afibrinogénémique.

En effet, les produits de dégradation de la fibrine donnent un trait intense dans la concavité duquel prend naissance une branche de faible intensité. Quant aux produits de fibrinogénolyse, ils donnent un trait qui porte cette branche sur sa convexité.

Ces précipitations en traits fourchus montrent que les produits de la fibrinolyse renferment au moins deux substances ayant des déterminants antigéniques différents. Ce type d'image s'explique, selon les travaux de SCHEIDEGGER *et al.* (1957), par l'existence de deux substances ayant des mobilités électrophorétiques voisines, dont l'une porte deux groupes déterminants et l'autre, un de ceux-ci seulement. Dans le cas présent, la substance porteuse des deux déterminants antigéniques est la plus éloignée du pôle négatif. La production de telles images implique la présence, dans l'immunsérum précipitant, d'au moins deux anticorps distincts correspondant aux deux déterminants antigéniques.

Ces résultats montrent donc que, lors de la fibrinolyse et de la fibrinogénolyse, l'antigène unique, mais complexe, est scindé en au moins deux

matériaux possédant un groupement antigénique commun et un groupement antigénique caractéristique de l'un d'eux seulement.

2°) Dégénération du fibrinogène purifié. — Les résultats exposés dans le paragraphe précédent n'ont pas été confirmés par NUSSENZWEIG et SELIGMANN (1960). Or ces auteurs ont utilisé, pour leurs essais, non pas du fibrinogène en milieu plasmatique, mais une préparation purifiée de cette protéine.

Afin d'élucider cette divergence, nous avons répété nos expériences à l'aide du fibrinogène purifié par la méthode de BLOMBACK.

Double diffusion en gelose. — Les produits de la fibrinolyse et ceux de la fibrinogénolyse donnent chacun deux traits de précipitation avec le sérum anti-fibrinogène. Comme le montre la figure 29, les lignes formées par les deux protéolysats fusionnent parfaitement, ce qui prouve leur identité antigénique. Par contre, elles ne donnent qu'une image d'identité partielle avec le fibrinogène. Les deux produits de digestion ont donc perdu au moins un des déterminants antigéniques du fibrinogène.

Analyse immunoélectrophorétique. — Les produits de la fibrinolyse et ceux de la fibrinogénolyse, obtenus après dégradation de 6 heures, donnent des diagrammes immunoélectrophorétiques identiques sous l'action du sérum anti-fibrinogène : une ligne de faible intensité en position α , une seconde, en position β (fig. 31). Ces deux lignes de précipitation se croisent. Elles correspondent donc à deux substances ayant des déterminants antigéniques différents qui peuvent dériver du fibrinogène aussi bien que de la fibrine.

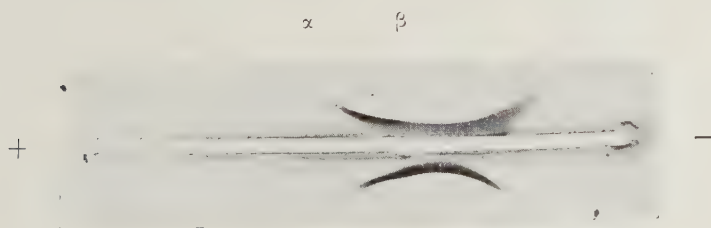


FIG. 31. Analyse immunoélectrophorétique des produits de fibrinolyse obtenus à partir de fibrinogène purifié et précipités par du sérum anti-fraction I de COHN traité par du plasma afibrinogénémique. Un diagramme identique est obtenu avec les produits de fibrinogénolyse préparés à partir du même matériel.

Nous retrouvons ainsi les deux constituants décrits par NUSSENZWEIG *et al.* (1961) sous les lettres D et E, le constituant E, le plus rapide, paraissant être en faible quantité.

Les différences observées entre les diagrammes obtenus avec les produits dérivés du fibrinogène plasmatique et ceux provenant du fibrinogène purifié, peuvent s'expliquer par un degré de dégradation plus poussé de la dernière préparation, hypothèse que confirment d'ailleurs les expériences suivantes.

30) Action inhibitrice du plasma sur la dégradation du fibrinogène et de la fibrine. — Du plasma humain frais, utilisé à diverses dilutions, a été ajouté à des échantillons de la solution de fibrinogène purifié. Ceux-ci ont ensuite été soumis à la fibrinogénolyse et à la fibrinolyse. Les diagrammes immunoélectrophorétiques obtenus avec ces divers mélanges sous l'action du sérum anti-fibrinogène sont différents (fig. 32). En effet, jusqu'à la dilution 1/20, le plasma inhibe la

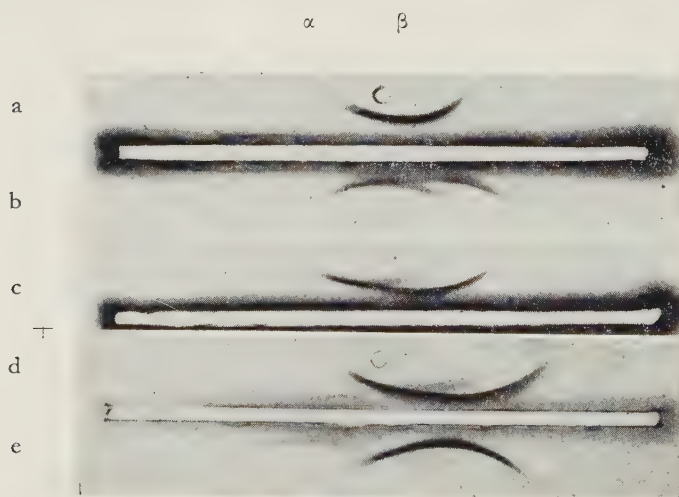


FIG. 32. Diagrammes immunoélectrophorétiques des produits de fibrinogénolyse obtenus à partir de plasma et de fibrinogène purifié additionné de quantités variées de plasma, la précipitation étant réalisée à l'aide du sérum anti-fraction I traité par du plasma afibrinogénémique.

a : en plasma

b : fibrinogène purifié additionné de plasma à la concentration finale de

c : 1/10

d : 1/20

e : 1/25

e : 1/32.

digestion du fibrinogène : le trait de précipitation, induit par les produits de fibrinogénolyse préparés en présence de plasma dilué au 1/20, présente encore l'aspect fourchu. L'adjonction de plasma plus dilué permet d'obtenir des diagrammes correspondant à une dégradation plus accentuée du fibrinogène. La séparation des deux lignes de précipitation est totale lorsque le plasma est dilué au 1/32.

Quant à la fibrinolyse, son inhibition requiert plus de plasma : les deux traits de précipitation sont déjà individualisés, à l'immunoélectrophorèse, malgré la présence dans le milieu de plasma dilué au 1/10. Dans ce cas également, il est possible d'obtenir des images intermédiaires entre le stade précoce de la lyse et le stade final, en faisant varier les quantités de plasma ajoutées au fibrinogène purifié.

Ces divers diagrammes s'expliquent par des degrés de dégradation différents : en effet, des images identiques sont observées lorsqu'on arrête la dégradation du fibrinogène purifié et de la fibrine obtenue à partir de ce matériel, à divers moments, par addition d'inhibiteur de soja. Dès les premières minutes, la lyse du substrat libère des substances donnant une image fourchue dont les branches s'écartent progressivement avec la durée de l'incubation. La séparation des lignes de précipitation est totale après 4 heures de dégradation enzymatique.

3. Discussion.

a) Structures antigéniques du fibrinogène et des produits de fibrinolyse et de fibrinogénolyse.

Les techniques immunochimiques, telles la précipitation en gélose et l'analyse imm.électr., montrent que le fibrinogène possède au moins trois groupements déterminant son antigénicité.

En effet, obtenus à partir de fibrinogène purifié, les produits de fibrinolyse comme ceux de fibrinogénolyse, donnent, à l'analyse imm.électr. deux lignes de précipitation sous l'action du sérum anti-fibrinogène. Ces deux lignes qui, dans certaines conditions, se croisent, sont donc induites par deux fragments porteurs de groupements antigéniques différents. Ces résultats, identiques à ceux de NUSSENZWEIG et SELIGMANN (1960), viennent d'être à nouveau confirmés par BERGLUND (1962).

D'autre part, en double diffusion en gélose, ces mêmes produits forment également deux lignes de précipitation donnant une réaction d'identité partielle avec le fibrinogène. Le segment du trait de précipi-

tation induit par le fibrinogène et responsable de la réaction d'identité partielle est formé par un ou des anticorps qui ne rencontrent pas le ou les déterminants antigéniques homologues dans les produits de digestion.

Le fibrinogène renferme donc, en plus des deux déterminants antigéniques présents dans les produits de sa dégradation, au moins un troisième groupement antigénique.

Nous avons affirmé qu'il est possible de distinguer par les méthodes immunochimiques, les produits de fibrinolyse de ceux de fibrinogénolyse (1959). Nous pouvons maintenir cette opinion, contestée par NUSSENZWEIG et SELIGMANN (1960), après avoir montré que cette distinction est possible à condition d'utiliser comme matériel de départ non du fibrinogène purifié, mais du fibrinogène en milieu plasmatique (fig. 33). En effet, l'adjonction de plasma, à diverses concentrations, au fibrinogène purifié inhibe sa digestion plus intensément que celle de la fibrine. Rappelons à ce propos qu'il est possible d'obtenir une fibrinolyse en milieu plasmatique sans qu'elle ne soit nécessairement accompagnée de fibrinogénolyse (SHERRY *et al.*, 1959). Or les images immunoélectrophorétiques et de double diffusion dépendent du degré de dégradation.

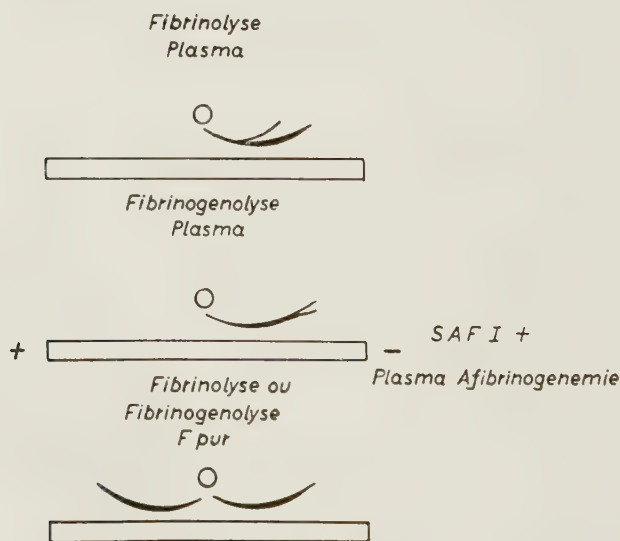


FIG. 33. Représentation schématique des diagrammes immunoélectrophorétiques obtenus avec des produits de fibrinolyse et de fibrinogénolyse préparés en plasma ou à partir de fibrinogène purifié, et précipités sous l'action du sérum anti-fraction I de COHN (SAF I) traité par du plasma afibrinogénémique.

atteint. En pratique, les images de digestion avancée devront faire soupçonner une fibrinolyse plutôt qu'une fibrinogénolyse.

b) Structure immunochimique de la fibrine.

Le fibrinogène et les monomères de fibrine paraissent avoir des motifs antigéniques identiques, puisqu'en solution molaire de bromure de sodium, leurs lignes de précipitation formées par le sérum anti-fibrinogène, en milieu gélosé, fusionnent parfaitement.

Il ne nous a donc pas été possible de différencier la fibrine du fibrinogène par les méthodes immunochimiques.

Le lapin semble répondre de façon différente à l'injection de fibrine et à celle de fibrinogène. Contrairement au sérum anti-fibrinogène, le sérum anti-fibrine précipite, par la technique d'OUCHTERLONY, le fibrinogène et les produits de fibrinolyse en donnant une image d'identité antigénique. Des sérums anti-fibrine obtenus chez trois lapins se sont montrés dépourvus d'au moins un des anticorps présents dans le sérum anti-fibrinogène. Ils renferment cependant les deux anticorps qui précipitent les produits de dégradation sous forme d'un trait fourchu ou de deux traits.

Il est intéressant de souligner que le sérum anti-produits de fibrinolyse donne des résultats identiques à ceux du sérum anti-fibrine. Rappelons que la fibrine, sous forme d'une suspension encore bien grossière par rapport aux dimensions cellulaires, est injectée par voie sous-cutanée ; elle doit nécessairement être dégradée avant de pouvoir être transportée vers les organes formateurs d'anticorps. C'est peut-être en raison de ce mécanisme que la fibrine n'induit pas la production du troisième anticorps correspondant à un des déterminants antigéniques du fibrinogène et de la fibrine monomère.

4. Conclusions.

1) Le fibrinogène humain porte au moins trois groupements déterminant son antigénicité.

2) Il n'a pas été possible de mettre en évidence de différence antigénique entre fibrinogène et monomères de fibrine, ni d'obtenir un anti-sérum qui soit spécifique de la fibrine et non du fibrinogène.

3) L'analyse imm.électr. et la double diffusion en gélose permettent d'apprécier le degré de dégradation du fibrinogène et de la fibrine sous l'action de la plasmine. Parmi les produits de digestion de ces deux

substrats, deux constituants, portant des groupements antigéniques différents, sont toujours précipitables par le sérum anti-fibrinogène.

4) Les techniques utilisant la précipitation en gélose ne permettent pas de distinguer les produits de fibrinogénolyse de ceux de la fibrinolyse, préparés au moyen de fibrinogène purifié. Par contre, lorsque ces produits de dégradation sont obtenus à partir de plasma, les images qu'ils donnent sous l'action du sérum anti-fibrinogène sont différentes, tant à l'analyse imm.électr. qu'en double diffusion en gélose.

CHAPITRE II

APPLICATIONS DE L'ÉTUDE IMMUNOLOGIQUE DU FIBRINOÈNE ET DE SES DÉRIVÉS

L'analyse immunochimique du fibrinogène et de ses dérivés constitue une nouvelle méthode d'investigation dans le domaine de la fibrinolyse. Elle permet de contrôler l'intégrité du fibrinogène ou de mettre en évidence des produits de dégradation du fibrinogène ou de la fibrine dans le sang humain.

a) Mise en évidence de produits de dégradation du fibrinogène ou de la fibrine, dans le sang humain normal.

Des essais d'épuisement du sérum anti-fibrinogène, de façon à le débarrasser de ses anticorps anti-protéines sériques, nous ont permis quelques observations en accord avec la théorie de la fibrinolyse continue.

Le sérum anti-fraction I de COHN, décrit au chapitre précédent, ne donne, avec le fibrinogène purifié selon la méthode de BLOMBACK et soumis à l'analyse imm.électr. qu'une seule ligne de précipitation située en face du réservoir de départ. Ce sérum, comme nous l'avons signalé plus haut, renferme cependant de nombreux anticorps anti-protéines plasmatiques. Notre fibrinogène est donc hautement purifié.

Soumis à l'analyse imm.électr. et révélés par le sérum anti-fraction I (fig. 34), les produits de la fibrinolyse comme ceux de la fibrinogénolyse, obtenus à partir de fibrinogène purifié, donnent deux lignes de précipitation en position α et β . Lorsque l'immunsérum a été traité par du sérum d'origine humaine, à raison d'une partie pour deux d'anti-sérum, ou par du plasma chauffé de façon à précipiter le fibrinogène, seule la ligne correspondant à la substance à mobilité β apparaît. Par contre, le sérum anti-fraction I traité par le plasma d'un individu atteint d'afibrinogénémie congénitale donne naissance, dans les mêmes conditions, aux deux lignes de précipitation.

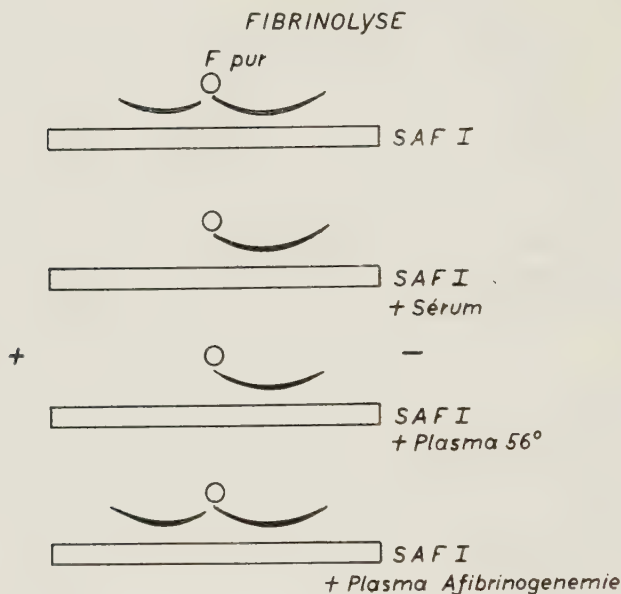


FIG. 34. Représentation schématique des diagrammes immunoélectrophorétiques obtenus avec des produits de fibrinolyse (ou de fibrinogénolyse) préparés à partir de fibrinogène purifié et précipités sous l'action du sérum anti-fraction I de COHN (SAF I), de cet anti-sérum traité par du sérum humain, de cet anti-sérum traité par du plasma défibriné par chauffage, de cet anti-sérum traité par le plasma d'un patient afibrinogénémique

Noter la disparition, dans les 2^e et 3^e diagrammes, de la ligne de précipitation induite par la substance à mobilité α .

Le sérum et le plasma humains normaux renferment donc la substance à mobilité α ou tout au moins le ou les déterminants antigéniques caractéristiques de cette substance. Rappelons cependant que l'anti-sérum traité par le plasma afibrinogénémique ne donne aucun précipité avec le sérum humain normal.

De plus, comme nous l'avons signalé plus haut (chapitre 1, page 157), les produits de la fibrinolyse comme ceux de la fibrinogénolyse, soumis à la double diffusion en gélose, donnent deux lignes de précipitation avec le sérum anti-fraction I traité par le plasma afibrinogénémique. Lorsque l'anti-sérum a été traité par du sérum ou du plasma chauffé d'origine humaine, la ligne de précipitation la plus externe n'apparaît plus (fig. 29). La substance induisant ce trait ou tout au moins le déterminant antigé-

nique porté par cette substance se trouve vraisemblablement dans le sang humain normal.

Les essais d'épuisement du sérum anti-fraction I de COHN montrent que le sérum comme le plasma humain renferment une substance antigéniquement identique au produit de dégradation du fibrinogène, caractérisé par sa mobilité électrophorétique α . Cette substance n'existe pas dans le plasma d'un patient atteint d'afibrinogénémie congénitale. S'agit-il d'un produit de fibrinolyse ou de fibrinogénolyse ? Cette substance est-elle libérée par la plasmine ou par d'autres enzymes protéolytiques ? Ces problèmes sont encore à résoudre. Cependant, nos observations suggèrent qu'il existerait une destruction continue de fibrinogène ou de fibrine dans le sang humain normal.

b) Application de l'immunochimie à l'étude de la fibrinolyse en pathologie humaine.

L'aspect du trait de précipitation que donne, en présence de sérum anti-fibrinogène, le fibrinogène soumis à l'analyse imm.électr., est fonction de son degré de dégradation. Le plasma frais donne un trait arciforme situé sous la cuvette de départ. Avec le vieillissement de la préparation de fibrinogène, ce trait s'allonge vers la cathode (fig. 28). Une dégradation plus poussée provoquera un dédoublement du trait sous la forme d'une fourche. Nous pensons donc que l'analyse imm.-électr. peut être utilisée pour différencier une hypofibrinogénémie provoquée par un défaut de synthèse de la protéine de celle qu'induirait une activité fibrinolytique exagérée.

1°) Hypofibrinogénémie en cas de cirrhose hépatique. — Chez 10 patients atteints de cirrhose du foie avec hypofibrinogénémie en dessous de 1 g/L, le plasma a été soumis à l'analyse imm.électr. et révélé par le sérum anti-fraction I traité par le plasma afibrinogénémique. Dans chaque cas, le fibrinogène a induit une ligne de précipitation parfaitement arciforme, à mobilité β . Jamais nous n'avons observé d'image fourchue. Ces résultats suggèrent que l'hypofibrinogénémie rencontrée chez ces patients est liée à un déficit de production du fibrinogène et non à sa destruction.

2°) Fibrinolyse pathologique. — Nous avons analysé, en analyse imm.électr. les plasmas de 3 sujets atteints de fibrinolyse aiguë. Deux patients étaient porteurs de cancer gastrique avec nombreuses métastases. La troisième avait développé un accident fibrinolytique à l'occasion du décollement prématuré d'un placenta normalement inséré.

Chez ces trois patients, le fibrinogène était inférieur à 0,3 g/L de plasma. Une intense activité fibrinolytique existait dans le sang circulant. En effet, le caillot de sang total se dissolvait spontanément en moins d'une heure. D'autre part, la technique des plaques de fibrine d'ASTRUP confirmait la présence de plasmine libre dans le sang circulant.

L'analyse imm.électr. des trois plasmas nous a fourni des diagrammes identiques : un trait de précipitation en position β , correspondant au fibrinogène, se prolongeant en un second, à mobilité plus lente, formé par les produits de dégradation du fibrinogène ou de la fibrine (fig. 35). Le sérum de nos patients, récolté sur acide ϵ -aminocaproïque afin d'inhiber l'activation de la fibrinolyse *in vitro*, renfermait aussi les produits de dégradation, comme le montre l'analyse imm.électr. (fig. 36). S'agit-il de produits de fibrinolyse ou de fibrinogénolyse ? Nous ne pouvons actuellement résoudre ce problème. Toutefois, vu le stade avancé de la dégradation, nous pensons qu'il s'agit plus vraisemblablement de produits de fibrinolyse. On considère d'ail-

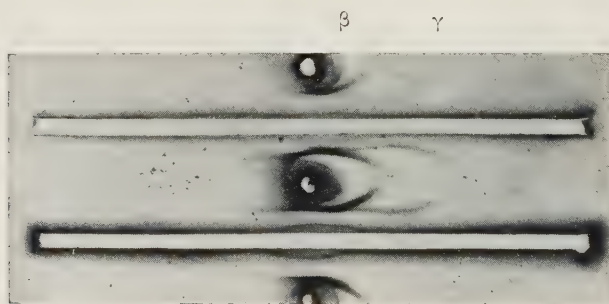


FIG. 35. Analyse immunoélectrophorétique du plasma d'une patiente atteinte de fibrinolyse aiguë, la précipitation étant réalisée par du sérum anti-fraction I de COHN traité par du plasma afibrinogénémique.

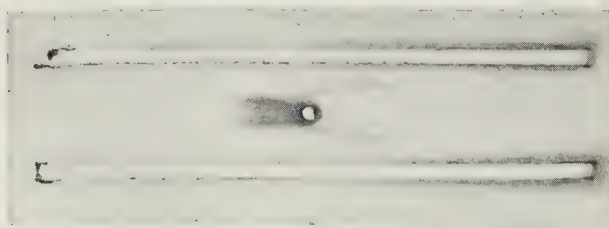


FIG. 36. Analyse immunoélectrophorétique du sérum de la même patiente (Cf. fig. 35), à l'aide du même anti-sérum.

leurs actuellement que certains accidents fibrinolytiques pourraient faire suite à une coagulation intra-vasculaire, elle-même induite par la libération de matériel thromboplastique dans la circulation (3^e partie, page 145).

Sur le sang de la patiente atteinte de fibrinolyse de cause obstétricale, une analyse imm.électr. a de nouveau été pratiquée après 24 heures de traitement par l'acide ϵ -aminocaproïque, à raison de 6 g toutes les 6 heures, par voie intra-veineuse. A ce moment, le trait induit par le fibrinogène reprenait un aspect normal (fig. 37). On ne trouvait plus de produits de dégradation. La patiente ne saignait d'ailleurs plus. Le fibrinogène plasmatique et les facteurs de coagulation étaient revenus à des valeurs normales.

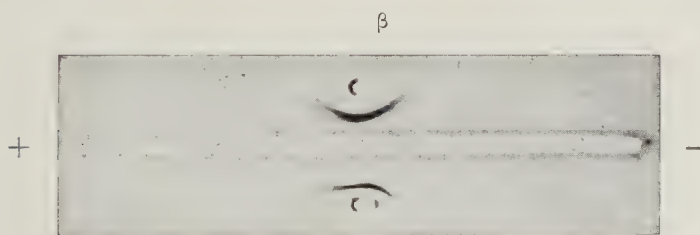


FIG. 37. Analyse immunoélectrophorétique du plasma de la même patiente après traitement par acide ϵ -aminocaproïque, la précipitation étant réalisée avec le même anti-sérum.

Le traitement par l'acide ϵ -aminocaproïque de nos deux malades atteints de cancer digestif diminue l'intensité du trait de précipitation anormal apparaissant l'analyse imm.électr. du plasma, sans le faire complètement disparaître ; en outre, il réduit, sans l'inhiber complètement, l'activité fibrinolytique sur plaque de fibrine.

3°) Fibrinolyse induite.

Lipopolysaccharides bactériens. — L'injection intraveineuse de Pyrexal, substance extraite de *Salmonella abortus equi*, provoque chez l'homme une élévation de température et déclenche une activité fibrinolytique intense atteignant son maximum 2 heures après l'injection (EICHENBERGER *et al.*, 1955 ; SAWYER *et al.*, 1960).

Cinq patients reçurent de 0,2 à 0,4 μ g de Pyrexal par voie intra-veineuse. Des échantillons de sang citraté et d'autres sans anticoagulant furent prélevés au temps 0, puis 2 heures après l'injection. Les plasmas,

soumis à l'analyse imm. électr., furent révélés par le sérum anti-fibrinogène. Ces mêmes plasmas, incubés 18 heures à 37°, ont de nouveau subi un examen immunoélectrophorétique. Dans aucun cas, même après incubation à 37°, nous n'avons observé de modification du trait de précipitation induit par le fibrinogène. Quant aux sérums recueillis immédiatement après coagulation et soumis à l'immunoélectrophorèse, ils n'ont donné aucun précipité sous l'action du sérum anti-fibrinogène. Par contre, le caillot, récolté 2 heures après l'injection du pyrogène et incubé à 37°, se dissout dans les heures suivantes en libérant des produits de fibrinolyse. Ceux-ci ont été identifiés à l'analyse imm. électr. sous forme d'un trait fourchu, tel celui que nous avons décrit lors de notre étude théorique de la fibrinolyse en milieu plasmatique (fig. 30, page 156).

Ces observations démontrent qu'il peut y avoir activation du système fibrinolytique, *in vivo*, sans fibrinogénolyse associée.

Dérivés de l'acide nicotinique. — L'injection intraveineuse de nicotinate de théophylline * est suivie, après 15 minutes, d'une intense activation du système fibrinolytique (SAWYER *et al.*, 1960).

Cinq sujets ont reçu, en injection intra-veineuse rapide, 600 mg de ce produit. Au temps 0 et 15 minutes après l'injection, on prélève 9 ml de sang sur 1 ml d'une solution de citrate trisodique à 3,8 % et 10 autres ml de sang qu'on laisse se coaguler. La moitié de chaque échantillon est additionnée de 0,5 ml d'une solution à 10 % d'acide ϵ -aminocaproïque, afin de bloquer l'activation de la fibrinolyse *in vitro*. Le fibrinogène plasmatique est dosé avant et après administration de Complamin.

Les échantillons de sang coagulé prélevés à la 15^e minute, sans acide ϵ -aminocaproïque, et incubés à 37°, subissent une dissolution complète en 3 heures.

Chaque plasma et sérum sont soumis à l'analyse imm. électr., la révélation étant effectuée par le sérum anti-fibrinogène. Dans chaque cas, on constate que le trait induit par le fibrinogène tend à se dédoubler vers la cathode lorsque le plasma est prélevé 15 minutes après l'injection de Complamin. Toutefois, sous l'action du sérum anti-fibrinogène, on ne voit apparaître aucun précipité avec le sérum récolté à la 15^e minute, en présence d'anti-fibrinolytique. Par contre, lorsque l'échantillon de sang coagulé, mais non additionné d'acide ϵ -aminocaproïque, est incubé à

* Produit commercialisé sous le nom de Complamin.

37°, le caillot libère des produits de fibrinolyse identifiables à l'immuno-électrophorèse.

La fibrinolyse déclenchée par le nicotinate de théophylline est capable d'induire une légère dégradation du fibrinogène. Celle-ci s'arrête à un stade initial, car on ne note pas de diminution du taux de fibrinogène coagulable sous l'action de la thrombine.

Ces observations confirment à nouveau qu'il peut y avoir une activation importante de la fibrinolyse dans le torrent circulatoire sans chute du taux du fibrinogène plasmatique qui, toutefois, peut subir de légères altérations.

Fibrinolyse induite dans un but thérapeutique. — L'injection de streptokinase ou du mélange plasmine-streptokinase dans la circulation permet la dissolution d'obstacles intravasculaires (4^e partie).

Chez 15 patients, soumis à la fibrinolyse thérapeutique, le plasma, prélevé en présence d'acide ϵ -aminocaproïque à divers moments du traitement, a été soumis à l'immunoélectrophorèse et révélé par le sérum anti-fibrinogène. Comme le montre la figure 38, le plasma recueilli au moment où le fibrinogène est aux environs de 50 ctg/L, donne à l'analyse imm.électr. un trait fourchu pareil à celui décrit lors de notre étude théorique de la fibrinogénolyse en milieu plasmatique (fig. 30, page 156). Malgré l'importance de la chute du fibrinogène, l'image qu'on observe à l'analyse imm.électr. correspond à un stade de dégradation peu accentué.

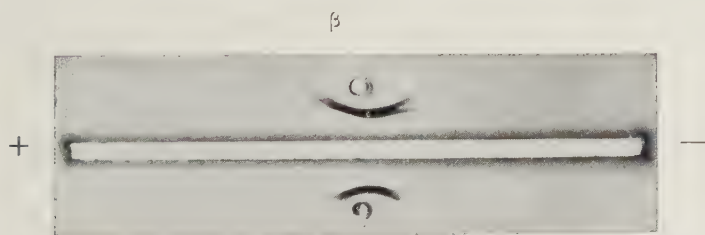


FIG. 38. Analyse immunoélectrophorétique du plasma d'un patient soumis à la fibrinolyse thérapeutique sous l'action de la streptokinase, la précipitation étant réalisée à l'aide du sérum anti-fraction I de COHN traité par du plasma afibrinogénémique.

Conclusions.

1) Les techniques immunologiques et, en particulier, l'analyse imm.électr. constituent une nouvelle méthode d'étude de la fibrinolyse

en clinique. Elles permettent de confirmer la dégradation enzymatique du fibrinogène et de la fibrine, puisque certains de leurs produits de lyse sont toujours précipitables par le sérum anti-fibrinogène. Elles permettent également d'apprécier le degré de fibrinolyse et de fibrinogénolyse.

2) L'analyse imm.électr. et la double diffusion en gélose montrent qu'il existe dans le sang humain normal des produits de dégradation du fibrinogène ou de la fibrine, substances qui pourraient être le résultat d'une activité fibrinolytique continue.

3) L'analyse imm.électr. permet de distinguer une hypofibrinogénémie provoquée par une insuffisance de production, de celle qu'induit une activité fibrinolytique anormale.

4) Cette technique peut être utile pour étudier la pathogénie des accidents fibrinolytiques. Elle pourrait permettre de différencier une fibrinolyse primitive, c'est-à-dire provoquée par la libération d'activateur du plasminogène dans la circulation, de celle qui serait secondaire à une coagulation intravasculaire.

5) Par l'analyse imm.électr., nous avons montré qu'il peut exister une intense activité fibrinolytique dans le sang circulant sans dégradation du fibrinogène, ou tout au moins avec une altération peu accentuée de ce dernier. Les techniques immunochimiques confirment donc que les anti-plasmines protègent le fibrinogène de sa dégradation par la fibrinolysine.

CONCLUSIONS

de la troisième partie

1. Le but principal qui suscita les recherches exposées dans cette quatrième partie, était de déceler des différences immunochimiques entre le fibrinogène et la fibrine. Nous espérons ainsi pouvoir préparer un réactif sérologique hautement spécifique, qui nous aurait permis de distinguer ces deux substances. Ce premier but n'a pu être atteint.

2. Afin de déterminer les motifs antigéniques du fibrinogène et de la fibrine, nous avons tenté de les séparer sous l'action de la plasmine. Ces essais nous ont mené à l'étude immunochimique des produits de fibrinogénolyse et de fibrinolyse. Ils nous ont permis de développer une nouvelle méthode d'investigation dans le domaine de la fibrinolyse en pathologie humaine.

QUATRIÈME PARTIE

**PLACE DE LA FIBRINOLYSE
DANS LA THÉRAPEUTIQUE
DES AFFECTIONS VASCULAIRES**

Nos recherches consacrées à la pathogénie du purpura thrombopénique (2^e partie) nous ont mené à l'étude des désordres que crée une activité fibrinolytique exagérée. Intéressé dès lors à la pathologie du système fibrinolytique, nous avons été naturellement conduit à envisager l'application de la fibrinolyse là où son activation fait défaut, c'est-à-dire dans les accidents thrombo-emboliques et particulièrement ceux qui intéressent les artères.

Malgré les nombreux travaux qui lui ont été consacrés, le traitement fibrinolytique est toujours au stade expérimental : ses modalités d'application ne sont pas encore exactement déterminées, son efficacité est toujours discutée, car les observations cliniques publiées sont trop souvent incomplètes et insuffisamment contrôlées (SHERRY *et al.*, 1962).

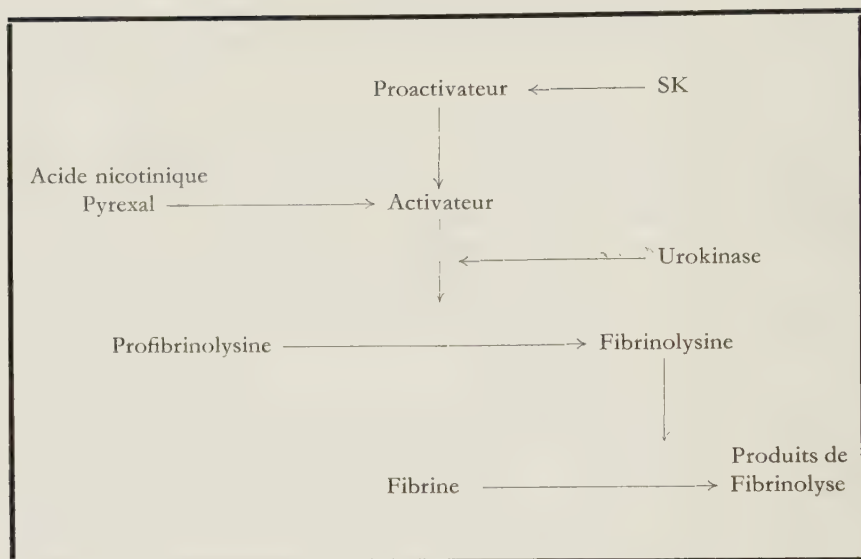
Notre expérience clinique remonte à environ deux ans (SALMON, LAMBERT et DELVIGNE, 1963). Grâce à la collaboration des radiologues, il nous a été possible de contrôler, par l'angiographie, le succès de notre thérapeutique chez la plupart de nos patients. Et c'est en cela que se différencie notre expérience de celle de la majorité des autres auteurs. Cependant, il est encore trop tôt pour discuter la valeur exacte de nos essais. Néanmoins, nous tenons à présenter ce chapitre, à titre d'illustration.

1. Agents fibrinolytiques.

Se référant au schéma du système fibrinolytique (Tableau XIX), il est aisé de comprendre les mécanismes d'induction de la fibrinolyse, dans un but thérapeutique. En effet, une activation de ce système enzymatique est possible à plusieurs niveaux.

1°) Nous disposons actuellement de médicaments entraînant une libération d'activateur dans le torrent circulatoire : ce sont les dérivés de l'**acide nicotinique** (WEINER *et al.*, 1958) et le **Pyrexal** (EICHENBERGER *et al.*, 1955). L'effet de ces substances, s'il est intense, n'est que de courte durée (SAWYER *et al.*, 1960). De plus, il s'épuise avec la répétition des injections. D'autre part, le caractère pyrogène du Pyrexal en limite l'utilisation clinique.

TABLEAU XIX



Possibilités d'activation de la fibrinolyse thérapeutique.

2°) La **streptokinase**, découverte dès 1933 par TILLET et GARNER, est certes la substance la plus intéressante dont nous disposons actuellement. Ce n'est que dans les dernières années que cet enzyme bactérien a pu être suffisamment purifié pour pouvoir être injecté à l'homme. Il est capable de transformer un proactivateur présent dans le sang humain en activateur qui, lui-même, transformera la profibrinolysine ou plasminogène en fibrinolysine ou plasmine.

Dans la circulation, cette fibrinolysine est rapidement neutralisée par les anti-plasmines. Par contre, selon SHERRY *et al.* (1959), les phénomènes se déroulent de façon différente dans un caillot. Un coagulum de fibrine, en milieu plasmatique, adsorbe de grandes quantités de plasminogène mais non les antiplasmines. Ainsi, l'activateur, diffusant dans le caillot, provoque-t-il la dissolution de ce dernier par voie endogène, car le taux d'inhibiteur, insuffisant, ne peut y entraver la fibrinolyse. Il paraît donc possible d'induire localement une intense activité fibrinolytique au niveau d'un thrombus en ne produisant cependant qu'une protéolyse modérée dans la circulation générale, c'est-à-dire avec une faible altération du fibrinogène et des facteurs de coagulation. Toutefois,

d'après notre expérience personnelle, le succès thérapeutique n'a été atteint qu'après induction d'une intense activité fibrinolytique dans le torrent circulatoire.

Si la streptokinase est actuellement l'agent fibrinolytique de choix, divers facteurs en limitent l'utilisation. En effet, les infections streptococciques, dont on connaît la fréquence, donnent aisément des taux d'anti-streptokinases élevés. Il faudra donc neutraliser ces anticorps avant de pouvoir induire une activité fibrinolytique chez le patient. D'autre part, cette substance étant hautement antigénique, elle donne très rapidement naissance à un taux élevé d'anti-streptokinases chez les sujets soumis à son action, ce qui entrave tout nouveau traitement dans les mois ultérieurs.

3°) L'**urokinase** est un activateur extrait de l'urine humaine (PLOUG et KJELDGAARD, 1957). Il n'est pas antigénique chez l'homme, avantage majeur par rapport à la streptokinase. Malheureusement, la plupart des préparations actuellement disponibles sont généralement pyrogènes et renferment du matériel thromboplastique, dont on conçoit aisément la nocivité. L'urokinase purifiée reste encore un matériel rare, dont il est dès lors malaisé d'apprécier l'effet thérapeutique.

4°) L'administration de **fibrinolysine** (plasmine) humaine purifiée semble être la thérapeutique logique des affections thrombo-emboliques. Toutefois, le taux élevé d'anti-plasmines normalement présentes chez l'homme suffit à neutraliser de fortes doses d'enzyme perfusé. Il sera donc indispensable, pour obtenir un effet thérapeutique, d'injecter cette substance en très grande quantité et aussi près que possible de la lésion. Il faut rappeler qu'un taux élevé de plasmine libre dans la circulation est susceptible d'induire une hypocoagulabilité grave, puisqu'elle détruit, en plus du fibrinogène et de la fibrine, certains facteurs de coagulation, tels le facteur V et le facteur VIII.

De plus, les produits de dégradation du fibrinogène et de la fibrine jouent le rôle d'anticoagulants, car ils entravent la polymérisation des monomères de la fibrine (NIEWIAROWSKI et KOWALSKI, 1958). C'est la raison pour laquelle il est dangereux d'associer les anticoagulants, directs ou indirects, au traitement fibrinolytique.

5°) D'autres enzymes ont été proposés comme agents thrombolytiques (FLETCHER, 1962). On citera en premier lieu la **trypsine**, dont on connaît le pouvoir protéolytique très étendu. Elle active également le plasminogène, mais est susceptible d'induire une intense destruction des

facteurs de coagulation. Cet enzyme ne pourra donc être utilisé dans le traitement des affections thrombo-emboliques.

Citons encore l'**aspergilline O**, enzyme protéolytique d'origine microbienne, et la **thrombine E**, thrombine acétylée ayant perdu son activité coagulante. La valeur thérapeutique de ces deux substances doit encore être déterminée.

Selon notre expérience clinique, la condition essentielle pour obtenir un effet thérapeutique dans les oblitérations vasculaires, est de maintenir, dans le plasma, une activité fibrinolytique intense et prolongée. A présent, cet état ne peut être obtenu qu'à l'aide de la streptokinase, ou éventuellement des mélanges de plasmine humaine et de streptokinase.

2. Indications du traitement fibrinolytique.

La littérature internationale (CLIFFTON, 1960 ; WRIGHT *et al.*, 1961), consacrée aux médications thrombolytiques, réserve surtout ces derniers agents aux **thromboses veineuses profondes**. En effet, la fibrinolyse permet d'éviter les embolies pulmonaires et les troubles lointains faisant suite aux obstructions veineuses. Si cette indication ne nous paraît certes pas négligeable, nous pensons toutefois que, dans de nombreux cas, le traitement par anticoagulants peut s'avérer suffisant.

Nous basant sur notre expérience clinique, nous estimons que les affections **thrombo-emboliques artérielles périphériques** doivent en premier lieu bénéficier de la thérapeutique fibrinolytique. On sait, en effet, que si la chirurgie vasculaire permet de lever les obstacles situés sur les gros troncs artériels, ce n'est qu'à la condition d'intervenir dans des délais très courts : dans les 6 à 7 heures qui suivent l'accident obstructif. En effet, une intervention plus tardive sera vouée très souvent à l'échec qu'expliquent, semble-t-il, de multiples thromboses périphériques secondaires. D'autre part, certaines opérations, en particulier celles qui intéressent le carrefour aortique, sont fréquemment suivies d'état de choc grave et leur sombre pronostic incite le chirurgien à la prudence. Quant aux oblitérations des petits vaisseaux, elles seront abandonnées au seul traitement médical. Notons que, dans de tels cas d'oblitérations artérielles, la décision thérapeutique ne sera prise qu'après une confrontation médico-chirurgicale.

D'autres indications peuvent être mentionnées mais, faute d'expérience, il nous est difficile de nous prononcer à leur égard : il faut citer les **thromboses de l'artère centrale de la rétine**, qui exige une théra-

peutique précoce, l'**embolie pulmonaire**, dont il est malaisé d'apprécier le résultat du traitement.

L'**infarctus du myocarde** retiendra davantage notre attention. On sait combien l'ischémie est nuisible pour le muscle cardiaque : une thérapeutique précoce est donc indispensable. D'autre part, il n'est généralement possible de dissoudre l'obstacle artériel qu'après plusieurs heures de traitement. On peut néanmoins espérer que la fibrinolyse facilitera le développement d'une circulation collatérale suffisante pour limiter les désordres créés par l'ischémie et empêcher la formation de thromboses secondaires. Cette application thérapeutique est actuellement à l'étude.

Les **oblitérations artérielles cérébrales** ne peuvent être soumises à la fibrinolyse thérapeutique, car l'ischémie cérébrale de courte durée suffit à induire des lésions irréversibles du parenchyme nerveux.

Deux expériences récentes et fructueuses de fibrinolyse dans des cas graves de **thrombose de sinus veineux cérébraux** nous incitent à considérer cette application comme des plus intéressantes.

L'intérêt de l'association **fibrinolyse thérapeutique et chirurgie** est encore discuté. Lorsque l'exérèse chirurgicale d'un obstacle artériel n'est pas suivie du réchauffement du membre ischémié, il semble logique de compléter l'acte opératoire par le traitement thrombolytique. À nos yeux, semblable ligne de conduite ne sera adoptée que lorsque l'intervention chirurgicale intéresse des vaisseaux périphériques et que l'hémostase est parfaitement réalisée. Toute intervention sur des vaisseaux profondément situés contre-indique la thérapeutique fibrinolytique.

Les contre-indications formelles de ce traitement sont les hémorragies en cours, l'hypertension artérielle sévère, les interventions chirurgicales profondes, datant de moins de quatre jours, les sensibilisations manifestes à l'agent utilisé.

3. Réalisation pratique du traitement fibrinolytique.

1°) Les agents fibrinolytiques que nous avons utilisés, sont la streptokinase (Kinalysin MERCK), Streptase BEHRING, Kabikinase KABI) et le mélange streptokinase-plasmine humaine (Fibrinolysin MERCK).

2°) L'installation et la surveillance de la thérapeutique demandent les examens suivants :

angéiographie : avant tout traitement, il est indispensable de localiser avec précision l'obstacle vasculaire par artério- ou phlébographie.

Cet examen, réalisé par le Prof. G. LEROUX et le Dr. J. DELVIGNE, permet de confirmer la présence de l'obstacle et, par comparaison avec un second examen pratiqué en fin de traitement, de juger de l'effet thérapeutique. Pour les affections artérielles, l'angéiographie se pratique selon la technique de SELDINGER : introduction d'un cathéter en polyéthylène dans l'artère, généralement par voie transcutanée, parfois après dénudation chirurgicale. Ce cathéter servira à la fois à la prise des radiographies et à la perfusion de l'enzyme.

test de sensibilité à l'enzyme et posologie : l'induction d'une activité fibrinolytique dans le sang circulant n'est possible qu'après neutralisation des inhibiteurs de la streptokinase et des anti-plasmines. Le taux de ces facteurs variant d'un individu à l'autre, il est indispensable de mesurer *in vitro* la sensibilité du patient à l'enzyme. Nous pratiquons ce test de la façon suivante : à une série de tubes contenant 1 ml de sang citraté, on ajoute des quantités croissantes de la préparation fibrinolytique et 10 unités de thrombine. Après avoir incubé ces tubes à 37°, on mesure le temps de lyse des caillots qui s'y sont formés. On établit ensuite un graphique montrant (en ordonnées) le temps nécessaire à la dissolution du caillot, en fonction (en abscisses à l'échelle logarithmique) de la concentration de l'enzyme (fig. 39). A l'aide de ce graphique, on détermine la concentration d'enzyme théoriquement nécessaire pour induire la lyse du caillot en 10 minutes. On multiplie cette dose par la masse sanguine, soit environ 5.000 ml, et on obtient ainsi la « dose initiale titrée ». Après avoir injecté en 15 minutes généralement par voie intra-artérielle, cette dose d'enzyme dissoute dans 50 ml de solution glucosée à 5 %, on installe, par la même voie, une perfusion continue soit de streptokinase à raison de 30.000 unités par heure, soit du mélange plasmine-streptokinase au débit de 50.000 unités * par heure. La quantité de l'agent thrombolytique perfusé par la suite sera adaptée en fonction des résultats fournis par le laboratoire.

contrôles biologiques : afin de vérifier l'efficacité de la thérapeutique et d'éviter un surdosage de l'enzyme, on mesure de façon régulière le taux de fibrinogène plasmatique selon la méthode de VERMYLEN *et al.* (1962). Dosé avant l'installation du traitement, une heure après son début, puis toutes les trois heures, ce taux sera maintenu si possible entre 0,5 et 1 g par litre de plasma. Cette condition nous paraît nécessaire à la réussite du traitement.

* Unités MERCK, SHARP et DOHME.

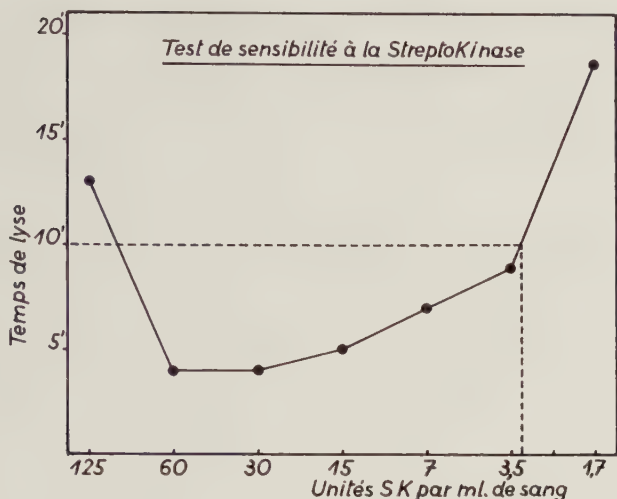


FIG. 39. Test de sensibilité à la streptokinase réalisé chez un patient avant l'installation d'un traitement fibrinolytique.

En ordonnées : temps de dissolution du caillot exprimé en minutes.

En abscisses : quantité de streptokinase contenue par ml de sang (échelle logarithmique).

En pointillés : détermination de la quantité de streptokinase induisant la lyse d'un caillot en 10 minutes.

La surveillance est complétée par la mesure régulière du temps de lyse du caillot obtenu en sang pur et dilué, test qui permet d'affirmer l'existence d'une fibrinolyse active (1^{re} partie, chapitre II, page 37), et par le contrôle du temps de QUICK.

Il peut être utile de doser le plasminogène. Ce test sera réalisé lorsque l'effet biologique obtenu sous l'action de l'enzyme est insuffisant. En effet, la disparition du plasminogène circulant empêche l'induction de la fibrinolyse dans le torrent circulatoire et rend, à nos yeux, la thérapeutique illusoire. Signalons que cette opinion n'est pas partagée, mais sans preuve valable, par VERSTRAETE et AMERY (1963).

pléthysmographie : chez les sujets atteints d'une obstruction artérielle des membres, on peut compléter la surveillance par la pléthysmographie digitale*. Cet examen, mis au point et pratiqué chez nos

* Examen réalisé à l'aide d'une capsule de MAREY fixée au doigt et reliée à une boîte hermétique, dont le fond est constitué par un microphone au carbone. Les variations de résistance subies par ce dernier, sous l'effet des pulsations, sont enregistrées par un appareil d'électrocardiographie (CUYPERS, 1964).

patients par le Dr. Y. CUYPERS, est réalisé au niveau de l'index ou du gros orteil. Il permet d'apprécier l'intensité et la cinétique de la pulsation, et de juger ainsi le degré de perméabilité des gros troncs artériels. Vu son innocuité et la facilité de sa réalisation, cette technique est des plus utiles pour le contrôle de l'efficacité du traitement fibrinolytique.

3°) La durée du traitement est de 48 heures au moins. Lorsque l'effet thérapeutique paraît atteint, on pratique, selon le cas, une artériographie ou une phlébographie de contrôle. Cet examen permet de confirmer la reperméabilisation vasculaire. Si cette dernière n'est pas complète, la thérapeutique fibrinolytique sera prolongée éventuellement pendant trois ou quatre jours. Le traitement sera suivi par l'administration d'héparine, puis d'anticoagulants indirects.

4. Complications du traitement fibrinolytique.

1°) **Fièvre.** — Lors du traitement thrombolytique, on peut certes craindre une élévation de température due au caractère antigénique des préparations utilisées et à la présence de pyrogènes dans certaines de celles-ci. Toutefois, nous n'avons que très rarement observé de la fièvre qui a toujours été rapidement jugulée par l'administration de corticoïdes.

2°) **Hémorragies.** — Celles-ci constituent un des principaux risques de la thérapeutique. Elles peuvent être provoquées par une intense hypofibrinogénémie, une destruction des facteurs de la coagulation et une libération, à partir du fibrinogène et de la fibrine, de substances jouant le rôle d'antithrombine.

Pour combattre les accidents hémorragiques, on dispose heureusement d'agents anti-fibrinolytiques hautement efficaces : l'acide ϵ -aminocaproïque, qui, administré par voie intra-veineuse à la dose de 0,1 g par kg de poids, toutes les 6 heures, inhibe l'activation du plasminogène ; l'inhibiteur de KUNITZ (Iniprol CHOAY) et celui de FREY (Trasylol BAYER) qui sont des anti-plasmines.

3°) **Hypotension.** — Dès le début du traitement, on constate parfois une hypotension de courte durée. Elle est vraisemblablement secondaire à un phénomène immunologique, la réaction entre streptokinase et anticorps homologues, ou à la libération, sous l'action de la fibrinolysine, de polypeptides vaso-actifs du type de la bradykinine (SALMON et LECOMTE, 1963 b), ou à l'action directe des protéines microbiennes.

Toute hypotension importante se manifestant au cours du traitement devra faire soupçonner avant tout une hémorragie profonde. Cet état impose la transfusion d'urgence.

4°) **Troubles psychiques.** — Nous avons observé chez certains patients des troubles psychiques toujours transitoires, consistant en délire et survenant chez les malades présentant des obstacles situés sur les gros troncs artériels, et dont les artères sont reperméabilisées après plusieurs heures d'ischémie. Il est possible que ces troubles soient secondaires à la résorption de produits du catabolisme à partir des membres lésés ou tributaires de petits foyers hémorragiques au niveau du cerveau.

5°) **Hématuries.** — Lorsque le traitement fibrinolytique est intense, on note fréquemment l'apparition d'hématuries. De courte durée, elles sont sans lendemain.

5. Résultats personnels.

Depuis deux ans, nous pratiquons le traitement fibrinolytique au cours des accidents thrombo-emboliques. Notre expérience porte essentiellement sur des cas d'obstruction artérielle. Jusqu'à ce jour, 50 patients atteints de thromboses ou d'embolies ont été traités. Ils se répartissent de la façon suivante :

— embolies artérielles :	29 cas
— thromboses artérielles des membres :	17 cas
— thromboses carotidiennes :	4 cas

Bien que nous ne nous soyons pas attaché au problème de la thrombose veineuse, nous avons traité avec succès une patiente atteinte d'une thrombose de la veine axillaire, et un sujet porteur d'une thrombose de la veine cave. Nous ajouterons à cette série deux cas particulièrement graves d'obstruction des sinus veineux cérébraux.

Les résultats obtenus au cours de ces divers traitements ont nécessité des quantités d'enzyme extrêmement variables d'un individu à l'autre : de 400.000 à 6.000.000 d'unités.

Le tableau XX résume notre expérience de la fibrinolyse thérapeutique. Le succès total est atteint lorsque la disparition de l'obstacle est confirmée par l'angéiographie. Nous appelons succès partiel la récupération du membre sans disparition complète de l'obstacle vasculaire.

Le nombre encore restreint de nos patients limite les conclusions de cette étude. Toutefois, on constate l'efficacité supérieure du traite-

TABLEAU XX

DIAGNOSTIC	Nombre de cas	SUCCES		
		Total	Streptokinase	Fibrinolytin
Obstructions artérielles				
— Embolies	29	17 + 5 partiels	12 + 5 partiels/21	5 / 8
— Thromboses : Membres	17	7 + 4 partiels	7 + 4 partiels/15	0 / 2
Carotides	4	0	0/4	
TOTAL	50	24 + 9 partiels	19 + 9 partiels/37	5 / 10
Obstructions veineuses				
— Sinus cérébraux	2	2	2/2	
— Membres	2	2	2/2	
TOTAL	4	4	4/4	

Résultats de notre expérience du traitement fibrinolytique,
dans les affections thrombo-emboliques, artérielles
et veineuses.

ment dans les cas d'embolies (58 % de guérison complète et 17 % de récupération du membre sans dissolution totale de l'obstacle) par rapport aux thromboses artérielles (41 % de succès total et 23 % de succès partiel). Ce pourcentage de succès est semblable à celui obtenu par d'autres auteurs (VERSTRAETE *et al.*, 1963).

En cas d'obstruction veineuse, le succès est atteint plus rapidement et avec des doses de streptokinase moins élevées.

L'heureux aboutissement d'une fibrinolyse combinée à l'antibiothérapie, dans deux cas de thrombose des sinus veineux cérébraux, doit être souligné. En effet, une telle indication ne semble guère avoir été retenue par les auteurs qui se sont intéressés au problème de la fibrinolyse thérapeutique.

La plupart de nos patients sont traités entre 8 et 24 heures après l'accident thrombo-embolique ; toutefois, il est encore possible d'obtenir un effet thérapeutique trois jours après l'oblitération vasculaire. Une trop grande latence entre l'accident et l'installation de la fibrinolyse entraîne souvent un échec thérapeutique.

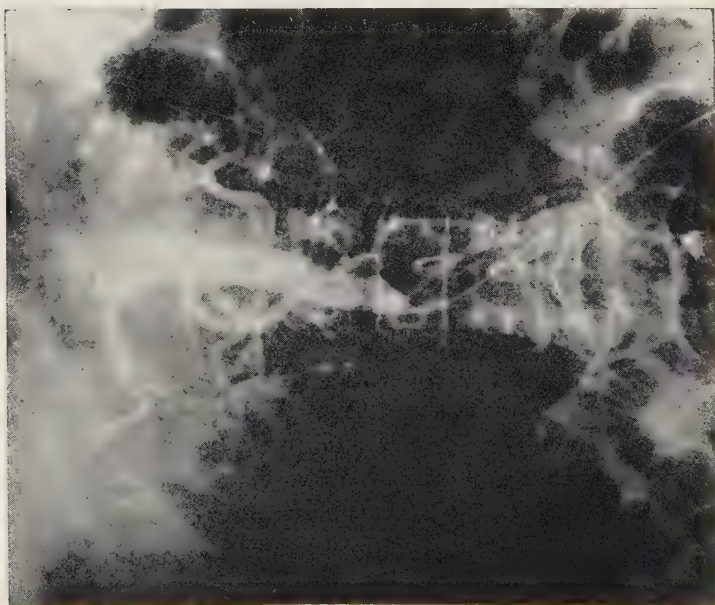
Voici, à présent, quelques observations cliniques qui permettront d'illustrer cet exposé.

a) Succès.

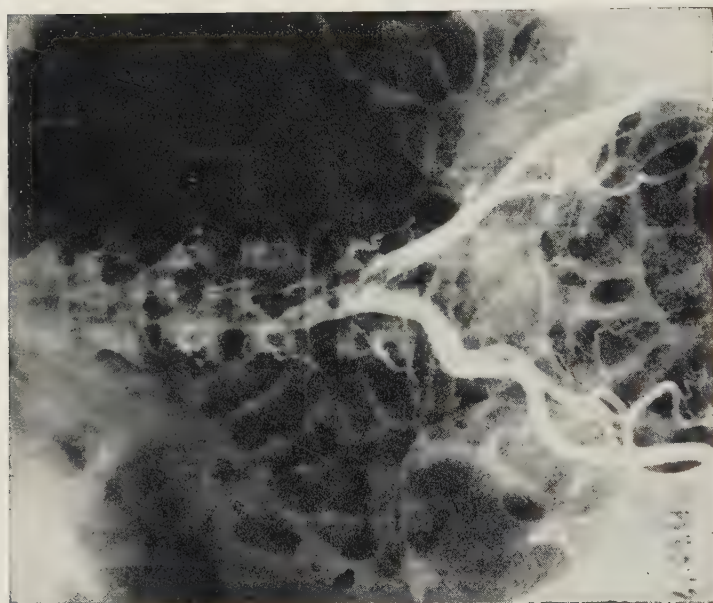
Cas n° 1 :

Le 22 septembre 1961, nous recevons à la garde du Service de Médecine, une femme âgée de 62 ans (VAN. J.) qui, 30 heures plus tôt, avait ressenti une violente douleur dans les deux jambes, suivie de refroidissement des membres inférieurs. Cette patiente est atteinte de maladie mitrale.

Une artériographie confirme le diagnostic d'embolie du carrefour aortique (fig. 40a). Vu l'âge de la lésion et l'état de la patiente, on ne peut entreprendre une exérèse chirurgicale de l'embole. La fibrinolyse est donc décidée. La perfusion de streptokinase débute à 18 heures. À 4 heures du matin, les membres inférieurs se réchauffent de façon spectaculaire. Après 48 heures de traitement, une artériographie est à nouveau pratiquée : elle montre une reperméabilisation partielle du carrefour aortique. La poursuite du traitement pendant 18 heures libère complètement les deux troncs iliaques (fig. 40b). La patiente nous quitte quelques semaines plus tard, après avoir totalement récupéré les membres inférieurs. Le traitement a été réalisé au moyen de 550.000 unités de streptokinase et de 6.900.000 unités de fibrinolysin MERCK.



a



b

FIG. 40. Artériographies pratiquées chez une patiente atteinte d'embolie du carrefour aortique, avant (a) et après (b) traitement fibrinolytique.

Cas n° 2 :

Mme DEP. D., âgée de 53 ans, est atteinte d'arythmie complète sur sténose mitrale. Le 9 février 1962, vers 10 heures du matin, elle ressent une douleur brutale dans les membres inférieurs qui deviennent froids. Elle ne peut se lever. A 20 heures, on palpe la fémorale droite, mais non la gauche. L'artériographie met en évidence un embole dans l'iliaque primitive gauche et un second dans la fémorale droite (fig. 41a et b).

Le traitement fibrinolytique est aussitôt instauré au moyen de streptokinase. Le lendemain à 10 heures, la jambe gauche est chaude, les artères tibiale postérieure et pédieuse y sont palpées. D'ailleurs, la pléthysmographie enregistre un pouls à peu près normal au niveau du gros orteil gauche (fig. 42). Par contre, le pied droit reste froid et insensible. Après 56 heures de traitement, ce pied se réchauffe brutalement ; les artères y sont à nouveau palpées, ce que confirme la pléthysmographie (fig. 42). Le traitement sera cependant poursuivi pendant 24 heures. L'artériographie, pratiquée à ce moment, prouve la libération de l'arbre vasculaire des deux membres (fig. 41c et d).

La dose de streptokinase injectée est de 1.700.000 unités, qui ont été perfusées en 80 heures. Cette patiente se présente régulièrement à notre consultation ; ses membres inférieurs restent en parfait état.

Cas n° 3 :

M. GOD. J. est un homme de 54 ans qui, 15 jours avant l'hospitalisation, s'est battu avec violence. Le 14 mars, à l'aube, il ressent une vive douleur dans le bras gauche qui se refroidit et se paralyse. Il est hospitalisé à 18 heures. L'artériographie est pratiquée en introduisant le cathéter de SELDINGER par l'artère fémorale gauche. Cet examen permet de poser le diagnostic de thrombose de l'artère sous-clavière gauche, vraisemblablement post-traumatique (fig. 43a). La pléthysmographie, enregistrée à l'index gauche, montre d'ailleurs un tracé rectiligne (fig. 44). Après 21 heures de traitement par la streptokinase, le bras est complètement réchauffé. L'artériographie confirme la reperméabilisation de l'artère (fig. 43b), comme le montre d'ailleurs le tracé pléthysmographique (fig. 44).

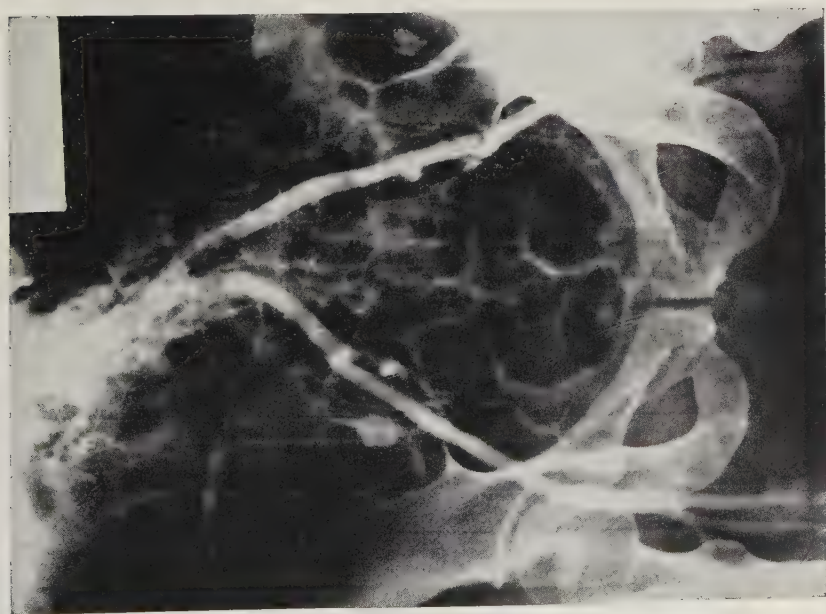
Le patient a reçu 1.200.000 unités de streptokinase. Ce traitement est alors poursuivi par la perfusion de 40.000 unités d'héparine par 24 heures, mais le 17 mars, à 8 heures, le patient développe un syndrome abdominal aigu compliqué de collapsus sévère. A 12 heures, une laparotomie est pratiquée dans des conditions désespérées : on découvre une importante quantité de sang rouge provenant de la rate. La splénectomie ramène un organe éclaté, avec divers fragments fortement nécrosés. La cause de cet accident remontait, semble-t-il, au combat livré par le patient 15 jours auparavant. Actuellement cet homme se porte parfaitement bien.



FIG. 41. Artériographies pratiquées chez une malade présentant des embolies iliaque (a) et fémoral droit (b), avant et après traitement fibrinolytique (c, d). (Voir page 189).



p



c

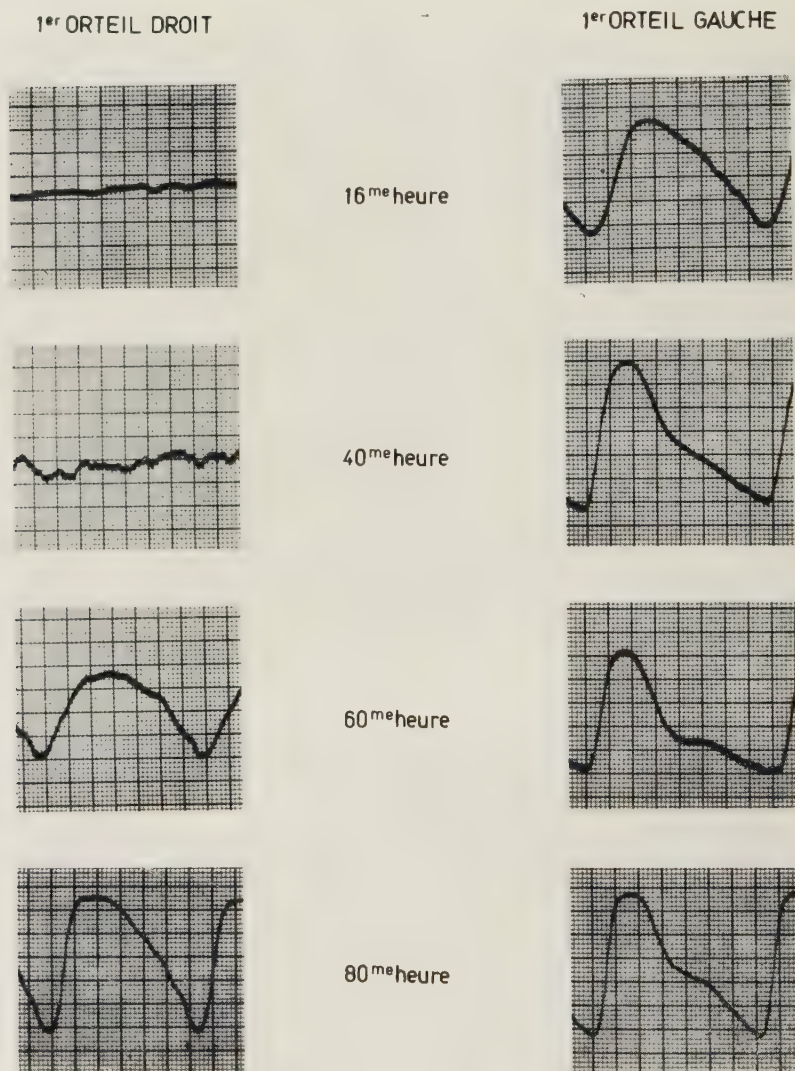


FIG. 42. Pléthysmographie pratiquée aux gros orteils de la patiente DEP. G. au cours du traitement fibrinolytique.

Noter la normalisation rapide du tracé à gauche, beaucoup plus lente à droite.

(vitesse de déroulement du papier : 50 mm/sec. ; la base d'un grand carré correspond à 0,1 sec. Il n'est pas tenu compte de l'amplitude absolue des pulsations, qui sont amplifiées de façon à permettre l'analyse morphologique du tracé).

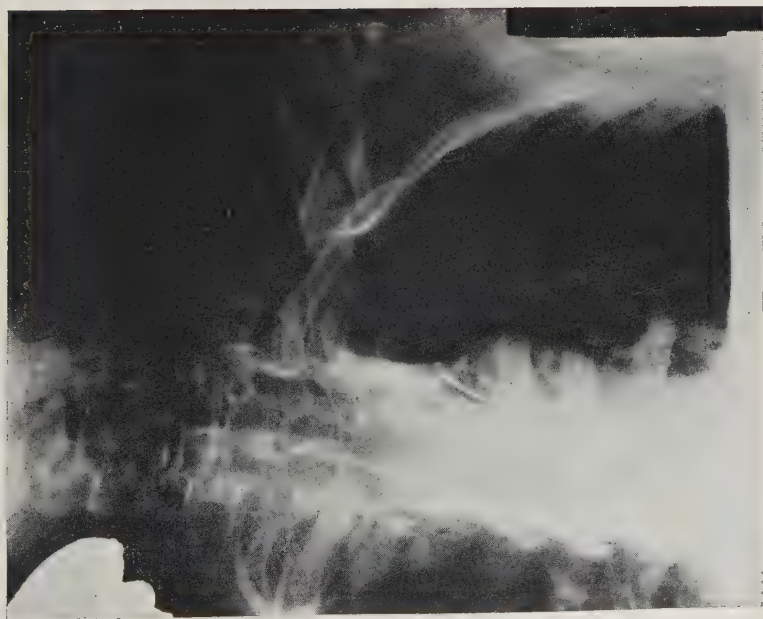
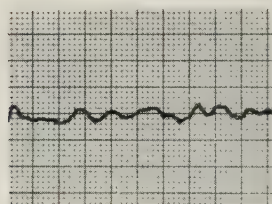
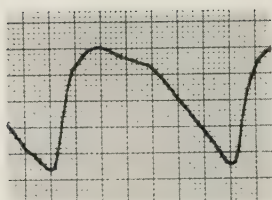


FIG. 43. Artériographies réalisées chez un homme atteint d'une thrombose de l'artère sous-clavière gauche, avant (a) et après (b) traitement fibrinolytique.

INDEX DROIT

INDEX GAUCHE

AVANT TRAITEMENT



APRES TRAITEMENT

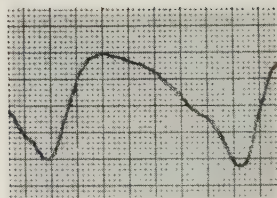
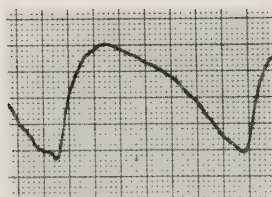


FIG. 44. Pléthysmographies enregistrées aux deux index chez le patient GOD. J., atteint d'une thrombose de l'artère sous-clavière gauche et soumis au traitement fibrinolytique.

Noter la normalisation du tracé au niveau de l'index gauche.

Cas n° 4 :

M^{me} BER. V. est atteinte d'un infarctus du myocarde depuis environ 4 jours lorsque, le 12 octobre 1962, à 23 heures, elle ressent une violente douleur dans le bras gauche qui se refroidit et se paralyse. Aussitôt hospitalisée, on lui pratique une artériographie qui met en évidence un embolie axillaire gauche (fig. 45a). Vu l'état cardiaque de la patiente,



FIG. 45. Artériographies réalisées chez une femme atteinte d'une embolie axillaire gauche, avant (a) et après (b) traitement fibrinolytique

on décide le traitement médical. Quarante-huit heures plus tard, l'examen radiographique montre un recul de l'obstacle d'environ 10 cm. Le traitement, poursuivi pendant 24 heures environ, libère complètement l'artère, comme le confirment artériographie (fig. 45b) et pléthysmographie.

La dose de streptokinase perfusée pendant 87 heures, est de 900.000 unités.

Cas n° 5 :

M^{me} KLU. E. est âgée de 56 ans. Elle souffre d'arythmie complète depuis 4 ans. Le 7 mai 1963, elle subit avec succès l'exérèse chirurgicale d'un embole situé dans l'artère humérale gauche. Dans la soirée du 10 mai, elle développe brutalement la symptomatologie classique d'embolie du carrefour aortique et est hospitalisée au Service de Médecine 3 heures plus tard. A ce moment, les membres inférieurs sont froids, cyanosés, insensibles sous les genoux ; aucune artère n'y est palpée. La patiente ne peut mouvoir les jambes. Une artériographie, réalisée en introduisant le cathéter de SELDINGER au travers du caillot, par l'artère fémorale droite, confirme le diagnostic d'embolie du carrefour aortique (fig. 46a). L'artère rénale droite est également oblitérée.

Le traitement fibrinolytique est instauré le 11 mai à 4 heures du matin. Après 24 heures de traitement, la jambe gauche est recolorée ; la sensibilité et la motricité y sont normales ; les artères fémorale et poplitée sont palpées. L'état de la jambe droite s'améliore. D'ailleurs, 36 heures après le début de la thérapeutique, l'artère fémorale droite bat faiblement. Le 13 mai, la patiente développe soudainement une hémiplegie droite ; elle demeure consciente, mais aphasique. Cet accident est vraisemblablement provoqué par une embolie cérébrale. Le traitement fibrinolytique est cependant poursuivi jusqu'au 16 mai, sans entraîner d'amélioration clinique, si ce n'est un certain amendement de la symptomatologie nerveuse. Une nouvelle artériographie, réalisée après 5 jours de fibrinolyse, confirme la reperméabilisation totale des artères du membre inférieur gauche et de l'artère rénale droite, et une libération partielle de l'arbre vasculaire de la jambe droite (fig. 46b). Vu l'état de cette jambe, son amputation doit être réalisée 5 jours plus tard. La dose d'enzyme perfusée en 130 heures est de 1.750.000 unités.

Cas n° 6 :

Le 25 janvier 1963, M. REM. J. développe un petit furoncle à l'aile du nez, qu'il s'empresse de percer. Deux jours plus tard, le nez se tuméfie davantage, tandis que l'infection se propage vers l'angle de l'œil droit. Bientôt se constitue le tableau classique de la thrombose de la veine angulaire. Devant une symptomatologie aussi bruyante, le médecin traitant confie son malade au Service de Chirurgie où, malgré l'antibiothérapie et la perfusion d'héparine pendant 30 heures, se développe une thrombose du sinus caverneux. Le 29 janvier, le patient évoluant

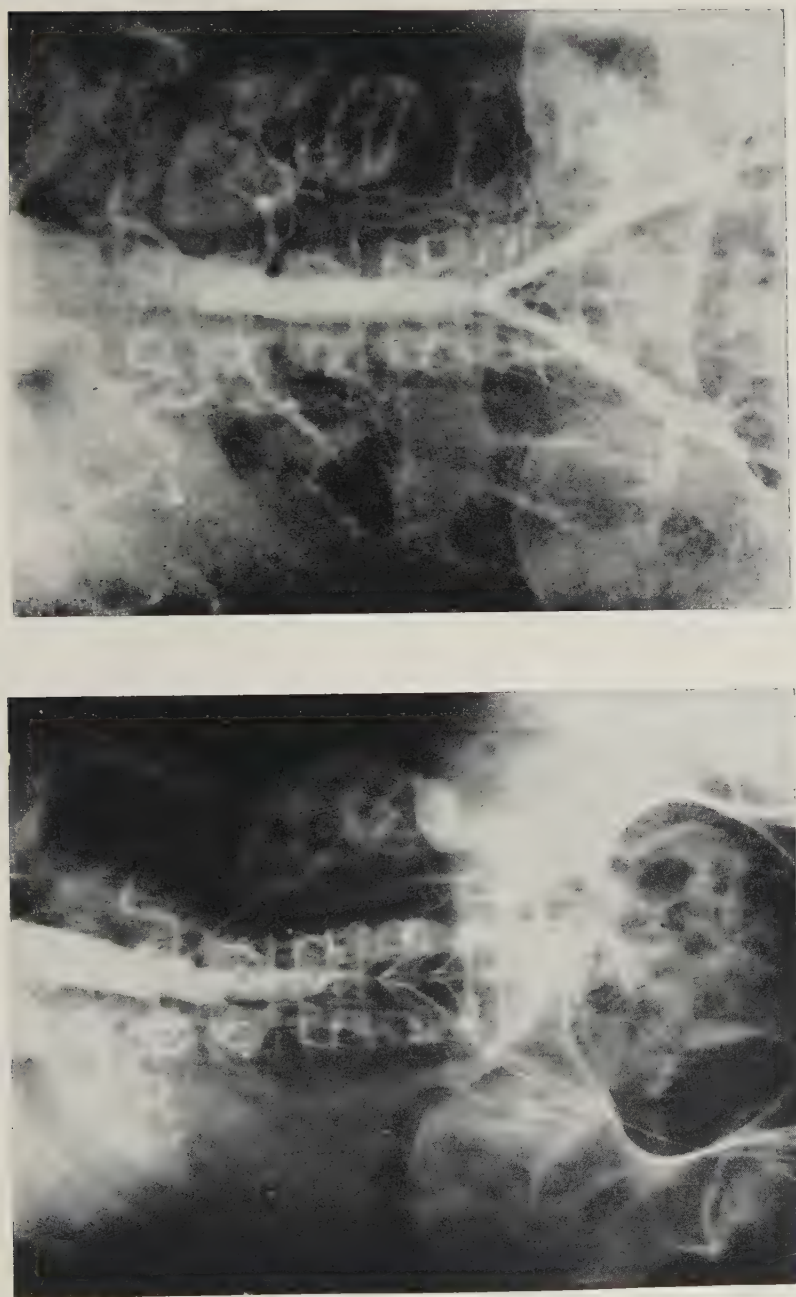


FIG. 46. Artériographies pratiquées chez une femme atteinte d'une embolie du carrefour aortique, avant (a) et après (b) traitement fibrinolytique. Noter également la reperméabilisation de l'artère rénale droite sans néphrogramme.



FIG. 47. Patient (R.E.M. J.) atteint d'une thrombose du sinus caverneux, avant (a) et après (b) traitement fibrinolytique

progressivement vers le coma, les chirurgiens nous demandent d'installer un traitement fibrinolytique, ce que nous faisons en poursuivant l'administration intra-veineuse d'érythromycine. Le 3 février, soit le 5^e jour de la thérapeutique, la guérison de cet accident dramatique est certaine.

Le traitement a nécessité 2.500.000 unités de streptokinase.

b) Echecs.

Cas n° 7 :

M. GOM... H., âgé de 83 ans, est atteint d'infarctus du myocarde depuis 5 jours, lorsque le 10 mars 1962 il ressent, vers 9 heures, une douleur brutale dans la cuisse gauche. La jambe se refroidit, perd sa sensibilité et sa motricité. Il est hospitalisé à 15 heures. A ce moment, on note une disparition des battements des artères poplitée, tibiale postérieure et pédieuse gauches. Une artériographie aussitôt pratiquée met en évidence un obstacle au niveau du canal de HUNTER, dans la jambe gauche.

Vu l'état du patient, on décide d'instaurer un traitement fibrinolytique à l'aide de streptokinase. Dès le lendemain, le membre inférieur gauche se réchauffe, l'artère poplitée gauche est bien palpée, mais quelques heures plus tard la jambe se refroidit à nouveau et de violentes douleurs y réapparaissent. Vers 16 heures, la symptomatologie s'aggrave. Les chirurgiens consultés décident l'amputation immédiate. A l'intervention, on découvre un caillot frais situé dans la partie haute de l'artère fémorale superficielle gauche. Par contre, on ne retrouve aucune trace de l'embole situé antérieurement au canal de HUNTER. Quelques instants après cette intervention chirurgicale, le malade meurt en état de choc.

L'échec de la thérapeutique a donc été provoqué par l'apparition d'un nouvel embole vraisemblablement d'origine cardiaque.

Cas n° 8 :

Le 12 août 1961, M. DUB... L., âgé de 38 ans, est admis d'urgence au Service de Chirurgie. Il vient de développer un syndrome d'oblitération du carrefour aortique après avoir reçu un traumatisme abdominal. L'intervention chirurgicale permet de découvrir une plaque d'athéromasie qui obstrue les deux artères iliaques primitives à leur naissance. Après l'exérèse de celle-ci, on note une amélioration de la circulation périphérique ; cependant la jambe gauche ne se réchauffe guère. Dans la nuit du 13 au 14 août, le patient ressent une vive douleur dans la jambe gauche qui devient froide, insensible et impotente. L'intervention chirurgicale permet de retirer un caillot de l'artère fémorale superficielle gauche. Toutefois, la jambe ne se réchauffe pas. Une artériographie aussitôt pratiquée révèle l'existence d'un obstacle sur l'artère tibiale antérieure gauche. A l'aide d'un cathéter introduit dans l'artère fémorale gauche, on installe

un traitement fibrinolytique 48 heures après l'accident initial. Cette thérapeutique sera poursuivie pendant 48 heures à l'aide de 4.000.000 d'unités de « **Fibrinolysin** » Merck. Malgré cette dose importante d'enzyme, on ne constate aucune amélioration de la symptomatologie. La jambe gauche doit être amputée au-dessus du genou, le 17 août. A l'intervention, on trouve une très mauvaise circulation sanguine au niveau de la tranche de section. L'étude anatomique de la jambe montre que les artères sont obstruées par des dépôts calcifiés.

L'échec de cette thérapeutique s'explique aisément puisque l'obstacle vasculaire, calcifié, ne pouvait être dissous par la plasmine.

Cas n° 9 :

M. GRI. J., âgé de 51 ans, est hospitalisé dans notre Service le 11 septembre 1962. Il se plaint de vives douleurs dans la jambe droite depuis le 7 de ce même mois. A l'examen, nous trouvons une jambe droite couverte de marbrures ecchymotiques. Le membre est insensible jusqu'à la partie supérieure de la rotule et est impotent. Une artériographie aussitôt pratiquée montre une oblitération de l'artère iliaque primitive droite, à sa naissance. Nous ne pouvons définir la nature thrombotique ou embolique de l'obstacle. Malgré le délai qui sépare l'oblitération, remontant semble-t-il à cinq jours auparavant, de l'hospitalisation, nous instaurons un traitement fibrinolytique. Celui-ci sera poursuivi à l'aide de 2.000.000 d'unités de streptokinase pendant 48 heures. Il provoquera un léger réchauffement du membre qui devra cependant être amputé. Une artériographie de contrôle, réalisée après deux jours de traitement, montre que le caillot obstruant l'artère iliaque primitive droite a toutefois été dissous sur une hauteur de 5 cm.

L'échec du traitement fibrinolytique s'explique aisément par la trop longue latence entre l'installation de l'obstacle vasculaire et le début de la thérapeutique.

Cas n° 10 :

M^{me} CHAT. M., âgée de 60 ans, est atteinte de maladie mitrale. Le 22 mars 1963, elle présente brutalement, vers 10 heures, la symptomatologie d'oblitération du carrefour aortique. Elle est hospitalisée dans notre Service 7 heures plus tard. A ce moment, les membres inférieurs sont froids, impotents et insensibles jusqu'aux genoux. Aucune artère n'y est palpée. L'artériographie aussitôt pratiquée met en évidence un obstacle aortique situé en dessous de la naissance de l'artère rénale gauche. Vu l'état de la patiente nous décidons d'instaurer une fibrinolyse thérapeutique à l'aide de streptokinase. Celle-ci débute à 19 heures et sera poursuivie pendant quatre jours à l'aide de 2.500.000 unités de streptokinase. Après 24 heures de traitement, on perçoit de légères pulsations au niveau de la fémorale gauche. Les deux membres se réchauffent légèrement sous les genoux, mais cette amélioration n'est que passagère. La malade meurt le 28 mars. L'autopsie permet de constater une importante disso-

lution du caillot primitif : l'aorte est libérée, l'artère iliaque primitive gauche est obstruée à 6 cm de sa naissance, l'iliaque primitive droite est complètement obstruée.

L'échec de la thérapeutique est vraisemblablement dû à l'importance de l'obstacle vasculaire, que la streptokinase n'a pu dissoudre entièrement.

Cas n° 11 :

Le 29 octobre 1963, nous recevons au Service de Médecine une femme de 72 ans qui, depuis 4 jours, se plaint de vives douleurs dans la jambe gauche. Celle-ci est couverte de marbrures ecchymotiques jusqu'au genou ; elle est froide, insensible et ne peut être mobilisée par la patiente. On n'y palpe aucune pulsation artérielle. Cette malade présentant des signes d'ischémie coronarienne, nous pensons qu'elle a développé une embolie de l'artère iliaque primitive gauche, bien que nous n'ayons pas de contrôle artériographique à l'appui. On ne palpe en effet aucune pulsation au niveau de l'artère fémorale gauche. Malgré la latence entre l'installation de l'obstacle, remontant vraisemblablement à 4 jours, et l'hospitalisation, nous instaurons un traitement fibrinolytique à l'aide de streptokinase. Celui-ci sera poursuivi pendant 4 jours sans récupération du membre. Toutefois, dès la 48^e heure, on percevait à nouveau un poulx fémoral gauche. La jambe dut être amputée à mi-cuisse le 2 novembre. A l'examen de la pièce anatomique, on eut la surprise de constater la libération complète des gros troncs vasculaires.

L'échec de la thérapeutique est vraisemblablement dû au fait que les tissus ischémiés étaient morts lors de la libération des gros troncs vasculaires.

6. Discussion.

Les résultats obtenus dans notre étude, basés sur un contrôle artériographique, démontrent qu'il est possible de provoquer la dissolution du caillot dans environ 50 % des cas d'obstructions artérielles aiguës. Il faut rappeler que la plupart de nos patients sont atteints d'ischémie extrêmement sévère, menant à l'impotence et à l'insensibilité du membre. Il n'est donc pas possible de comparer nos résultats thérapeutiques à ceux qui ont été obtenus après traitement médical classique, ou même après abstention thérapeutique, par certains auteurs (COBLENTZ *et al.*, 1962). En effet, leur matériel, différent du nôtre, n'a pas été soumis au contrôle artériographique. Nous ne pouvons non plus confronter actuellement nos résultats aux statistiques chirurgicales. En effet, nombre de nos patients ne sont pas justiciables d'un traitement chirurgical. On ne peut donc affirmer la supériorité de l'un ou de l'autre traite-

ment, puisque les indications sont différentes. L'étude comparée des deux thérapeutiques, fibrinolytique et chirurgicale, doit encore être réalisée sur un matériel clinique identique.

Quelques considérations se dégagent de notre expérience du traitement fibrinolytique. Ainsi, les embolies paraissent plus facilement lysées que les thrombus artériels. Le succès thérapeutique est atteint plus aisément si l'obstacle est haut situé sur l'arbre vasculaire. Ce fait s'explique, pensons-nous, par l'existence, dans ces cas, d'une circulation collatérale qui assure une certaine irrigation périphérique, maintenant ainsi les tissus en vie et permettant l'attaque de l'obstacle par l'enzyme fibrinolytique, à la fois par l'amont et par l'aval. Il faut en plus signaler que la fibrinolyse thérapeutique libère des substances vaso-actives, vraisemblablement identiques à la bradykinine dont l'action vasodilatatrice chez l'homme est bien connue (SALMON et LECOMTE, 1963 b).

Le succès du traitement fibrinolytique dépend de sa précocité, puisque l'ischémie prolongée entraîne la mort des tissus sous-jacents à l'obstacle. S'il est intensif, précoce et suffisamment prolongé, il sera fréquemment efficace.

Nombre de nos échecs s'expliquent soit par une trop grande latence entre l'accident et l'installation de la thérapeutique, soit éventuellement par l'existence de lésions artério-scléreuses avancées. Notons enfin que chez plusieurs patients dont le membre ischémié dut être amputé on constata la disparition de l'obstacle vasculaire : la trop longue ischémie avait entraîné la mort des tissus qu'il était dès lors impossible de récupérer.

Si le traitement fibrinolytique est efficace, il n'est certes pas sans danger. En effet, un surdosage d'enzyme pourra provoquer la destruction de divers facteurs de coagulation, une afibrinogénémie conduisant à des hémorragies catastrophiques. D'autre part, un dosage insuffisant ne conduira qu'à des échecs. Il s'agit donc d'un traitement difficile, qui ne sera entrepris que sous la surveillance médicale continue, avec l'aide d'un laboratoire connaissant parfaitement les problèmes de coagulation et de fibrinolyse, et capable de fonctionner à toute heure du jour et de la nuit.

7. Conclusions.

1) L'activation de leur propre système fibrinolytique peut être appliquée au traitement des patients atteints d'affections thrombo-emboliques.

2) Le meilleur activateur de la fibrinolyse dont nous disposons actuellement, est la streptokinase.

3) A l'aide de cet enzyme bactérien, il est possible de provoquer la dissolution de l'obstacle vasculaire dans environ 50 % des obstructions artérielles aiguës.

4) Le traitement fibrinolytique, toujours au stade de l'expérimentation clinique, nécessite une surveillance biologique sévère dont dépend son succès et son innocuité pour le patient.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

— Notre connaissance du rôle physiologique que jouent certains systèmes enzymatiques peut être le fait de l'observation clinique ou de la reproduction expérimentale de certaines maladies chez l'animal. Ce mode d'étude nous a permis de déterminer certains aspects du rôle physiologique ou physio-pathologique du système fibrinolytique, chez l'homme et chez l'animal

— Le premier but des recherches faisant l'objet de ce mémoire était de jeter quelques lumières sur l'intervention du facteur vasculaire dans l'hémostase. Pour aborder cette étude, nous nous sommes intéressé à la pathogénie des lésions purpuriques survenant dans les thrombopénies. L'apparition de ces lésions dépend à la fois d'une chute du taux des plaquettes et d'altérations vasculaires.

— Afin d'expliquer la fragilité vasculaire, généralement fonction inverse de la thrombocytose, nous avons recherché, mais en vain, la présence du matériel plaquettaire dans les vaisseaux normaux. Cette étude, entreprise à l'aide de techniques immuno-chimiques, a permis par contre d'approfondir notre connaissance de la structure antigénique des plaquettes.

— Les altérations vasculaires, responsables de l'apparition des pétéchies dans le purpura thrombopénique induit chez le rat à l'aide de sérum anti-plaquettes, sont secondaires à la libération d'enzymes protéolytiques et vraisemblablement fibrinolytiques, dont il est possible d'entraver l'action à l'aide de substances inhibant l'activation du système fibrinolytique.

— La seule réduction du taux des plaquettes et l'activation isolée du système fibrinolytique ne peuvent engendrer de purpura. Celui-ci survient lorsque les deux facteurs sont associés. Ces observations, réalisées chez le rat, ont été confirmées dans certains cas de pathologie humaine.

— Chez le rat, les réactions antigène-anticorps, et en particulier la réaction plaquettes-sérum anti-plaquettes, se déroulant dans le torrent circulatoire activent le système fibrinolytique. Le complément pourrait jouer un rôle dans ce processus. Le simple phénomène immunologique

peut donc expliquer l'activation de la fibrinolyse lors du purpura thrombopénique immunologique induit chez le rat.

En pathologie humaine, l'activité fibrinolytique anormale qu'on rencontre généralement chez les patients thrombopéniques atteints de purpura, ne révèle que rarement son étiologie. De nouvelles recherches sont donc nécessaires pour en préciser le mécanisme.

— Le lieu et le mode d'action des enzymes fibrinolytiques au niveau de la paroi vasculaire doivent encore être précisés, car, à l'état normal, on n'y trouve ni fibrine ni fibrinogène. Certains de nos essais suggèrent toutefois que les vaisseaux seraient le siège d'une activation physiologique du système fibrinolytique, réalisant peut-être un équilibre entre une coagulation et une fibrinolyse continues. Cette théorie, que rien ne permet actuellement de prouver ou de rejeter, nécessite de nouveaux développements.

— Nos recherches nous paraissent justifier l'emploi d'agents anti-fibrinolytiques, et particulièrement de l'acide ϵ -aminocaproïque, dans la prévention et le traitement des hémorragies compliquant les thrombopénies.

— Notre connaissance du système fibrinolytique dépend du développement des techniques mesurant ses activités à divers échelons. Nous proposons une nouvelle méthode d'exploration dans ce domaine : l'immunochimie du fibrinogène, de la fibrine et des produits de leur dégradation. Les méthodes immunologiques permettent l'analyse du substrat de la dégradation enzymatique et nous donnent la possibilité d'en affirmer la destruction et d'en préciser le degré.

— Le système fibrinolytique participe au mécanisme de défense de l'organisme. Il est activé en cas d'oblitération vasculaire. Il joue ainsi un rôle dans le maintien de la libre circulation du sang dans les vaisseaux. Il est possible d'exacerber ce processus biologique dans un but thérapeutique. Sur ces bases, nous avons appliqué le traitement fibrinolytique chez plus de cinquante patients. Toutefois, cette thérapeutique, qui nous a donné d'excellents résultats et qui est pleine de promesses, est toujours au stade de l'investigation clinique et doit y rester tant que ne seront pas résolus divers problèmes majeurs concernant la physio-pathologie de la fibrinolyse.

— La poursuite des recherches dans l'étude des interrelations existant entre la fibrinolyse et la pathologie vasculaire permettra de jeter

de nouvelles lumières sur la signification physiologique du système fibrinolytique dont l'étude doit nécessairement compléter celle de la coagulation. Il faut toutefois rappeler que l'action de ce système ne se limite pas au compartiment intra-vasculaire : il intervient, en effet, dans les processus de cicatrisation ; il maintient la perméabilité de divers canaux d'excrétion et participe à certains phénomènes de reproduction. De nombreuses voies d'approche sont donc offertes aux chercheurs désireux d'enrichir notre science de la fibrinolyse.

BIBLIOGRAPHIE

- ABE, T. et SATO, A. : Inhibitory activity of ϵ -aminocaproic acid on fibrinolysis. *Acta haemat. Jap.*, **21**, 305 (1958).
- ACHARD, Ch. et AYNAUD, M. : Les globulins dans l'anaphylaxie. *C.R. Soc. Biol.*, **61**, 85 (1909).
- ADELSON, E., RHEINGOLD, J. et CROSBY, W. : The platelet as a sponge : a review. *Blood*, **17**, 767 (1961).
- ALBRECHTSEN, O. : Fibrinolytic activity in the organism. *Acta physiol. scand.*, **47**, suppl. 165 (1959).
- ALKJAERSIG, N., FLETCHER, A. et SHERRY, S. : Activation of human plasminogen. I. — Spontaneous activation in glycerol. *J. biol. Chem.*, **239**, 81 (1958).
- ALKJAERSIG, N., FLETCHER, A. et SHERRY, S. : The mechanism of clot dissolution by plasmin. *J. clin. Invest.*, **38**, 1086 (1959).
- ALKJAERSIG, N., FLETCHER, A. et SHERRY, S. : ϵ -aminocaproic acid : an inhibitor of plasminogen activation. *J. biol. Chem.*, **234**, 832 (1959).
- AMBRUS, C. et MARKUS, G. : Plasmin-antiplasmin complex as a reservoir of fibrinolytic enzyme. *Am. J. Physiol.*, **199**, 491 (1960).
- ASTRUP, T. : The haemostatic balance. *Thromb. Diath. haemorrh.*, **2**, 347 (1958).
- ASTRUP, T. : Role of blood coagulation and fibrinolysis in the pathogenesis of arteriosclerosis. *Connective Tissue, Thrombosis and Atherosclerosis*, I.H. Page, éd., Academic Press, New York-London (1959) ; page 223.
- ASTRUP, T. et STERNDOFF, I. : An activator of plasminogen in normal urine. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **81**, 675 (1962).
- ASTRUP, T. et MÜLLERTZ, S. : The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.*, **40**, 346 (1952).
- ASTRUP, T., RASMUSSEN, J., AMERY, A. et POULSEN, H. : Fibrinolytic activity of cirrhotic liver. *Nature*, **185**, 619 (1960).
- BEDSON, S. : Blood platelet anti-serum, its specificity and role in the experimental production of purpura. *J. Path. Bact.*, **25**, 94 (1922).
- BERGLUND, G. : Immuno-electrophoretic studies of fibrinogen, plasmin and lytic products of fibrinogen and fibrin. *Int. Arch. Allergy*, **21**, 193 (1962).
- BIGGS, R.M., MACFARLANE, R. et PILLING, J. : Observations on fibrinolysis. — Experimental activity produced by exercise or adrenalin. *Lancet*, **1**, 402 (1947).
- BLOMBÄCK, B. et BLOMBÄCK, M. : Purification of human and bovine fibrinogen. *Arkiv Kemi*, **10**, 415 (1956).

- BORN, G. et GILSON, R. : Studies on the uptake of 5-hydroxytryptamin by blood platelets. *J. Physiol.*, **146**, 472 (1959).
- BOUNAMEAUX, Y. : Dosage des facteurs de coagulation contenus dans l'atmosphère plasmatique des plaquettes humaines. *Rev. franc. Et. clin. biol.*, **2**, 52 (1957).
- BOUNAMEAUX, Y. : Méthodes utilisées pour l'étude des plaquettes dans les diathèses hémorragiques. Huit Colloques de Biologie clinique, Presses académiques européennes, éd., Bruxelles (1958) ; page 673.
- BOWMAN, D. : Fraction derived from soy beans and navy beans which retard tryptic digestion of casein. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **57**, 139 (1944).
- CALARESU, F. et JAKES, L. : Thrombocytopenia in the experimental production of hemorrhagic death by multiple factors. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **38**, 1275 (1960).
- CATTAN, A., SCHWARZENBERG, L., SCHNEIDER, M., AMIEL, J. et MATHE, G. : Essai de traitement par l'acide ε -aminocaproïque de patients atteints de syndromes hémorragiques, en particulier de syndromes liés à une thrombocytopenie. *Presse Médicale*, **71**, 2037 (1963).
- CHAMBERS, R. et ZWEIFACH, B. : Topography and function of the mesenteric capillary circulation. *Amer. J. Anat.*, **75**, 173 (1944).
- CLARK, W. et JACOBS, E. : Experimental non-thrombocytopenic vascular purpura : a review of the Japanese literature with preliminary confirmatory report. *Blood*, **5**, 320 (1950).
- CLIFFTON, F. : Symposium on fibrinolysis. *Am. J. Cardiol.*, **6**, 361 (1960).
- COBLENTZ, B., LENEGRE, J. et RODOKANAKIS, C. : Les occlusions artérielles aiguës des membres à évolution régressive. *Bull. Soc. méd. Hôp. Paris*, **113**, 1019 (1962).
- COCHRANE, C. : La technique des anticorps fluorescents ; applications à la microbiologie et au phénomène d'Arthus. *Ann. Inst. Pasteur*, **99**, 329 (1960).
- COONS, A. et KAPLAN, M. : Localization of antigens in tissue cells. Improvement in a method for the detection of antigens by means of fluorescent antibodies. *J. exp. Med.*, **91**, 1 (1950).
- COPLEY, A. : Effet capillorragique de la fibrinolysine et de l'anti-fibrinolysine sur la membrane nictitante du lapin normal et exposé aux rayons X. *Arch. int. Pharmacodyn.*, **99**, 427 (1954).
- COPLEY, A. et GELOT, B. : Experimental production of vascular purpura in guinea pigs by guinea pig anti-fibrin serum of rabbits. *Amer. J. Physiol.*, **187**, 593 (1956).
- CUYPERS, Y. : La pléthysmographie digitale. *Angiologie* (1964) sous presse.
- DASTRE, A. : Fibrinolyse dans le sang. *Arch. Physiol. norm. path.*, **5**, 661 (1893).
- DAUSSET, J. : Immunohématologie biologique et clinique. Flammarion, Ed., Paris (1956).

- DONNELLY, T., LASKOWSKI, M., NOTLEY, N. et SCHERAGA, H. : Equilibria in the fibrinogen-fibrine conversion. II. — Reversibility of the polymerisation steps. Arch. Biochem. Biophys., **56**, 369 (1955).
- DUDOK DE WIT, C., KRIJNEN, H. et den OTTOLANDER, G. : The measurement of fibrinolytic activity with I^{131} -labeled clots. Thromb. Diath. haemorrh., **8**, 315 (1962).
- DUGUID, J. : The role of the connective tissue in arterial diseases. Connective Tissue, Thrombosis and Atherosclerosis, I.H. Page, éd., Academic Press, New York-London (1959) ; page 13.
- EICHENBERGER, E., SCHMIDHAUSER-KOPP, M., HURNI, H., FRICISAY, M. et WESTPHAL, O. : Biologische Wirkungen eines hochgereinigten Pyrogen (Lipopolysaccharid) aus *Salmonella abortus equi*. Schweiz. Med. Wschr., **85**, 1190 (1955).
- FANTL, P. et SIMON, S. : Fibrinolysis following electrically induced convulsions. Austral. J. exp. biol. med. Sc., **26**, 521 (1948).
- FEARNLEY, G. et TWEED, J. : Evidence of an active fibrinolytic enzyme in the plasma of normal people with observations on inhibition associated with the presence of calcium. Clin. Sci., **12**, 81 (1953).
- FEARNLEY, G., BALMFORTH, G. et FEARNLEY, E. : Evidence of a diurnal fibrinolytic rhythm, with a simple method of measuring natural fibrinolysis. Clin. Sci., **16**, 645 (1955).
- FLETCHER, A. : Developments in thrombolytic therapy. Les Enzymes en Thérapeutique, Méd. et Hyg., éd., Genève, (1962).
- FLORKIN, M. : Studies in the physical chemistry of the proteins. VII. The solubility of fibrinogen in concentrated salt solution. J. biol. Chem., **87**, 629 (1930).
- FRANK, E. : Die hämorrhagischen Diathesen. Schittenhelms Handbuch der Krankheiten des Blutes und der blutbildenden Organen, Springer, éd., Berlin, (1925), **2**, 289.
- FREY, E., KRAUT, H., WERLE, E., : Kallikrein, F. Enke, éd., Stuttgart, (1950).
- GANS, H. et KRIVIT, W. : Study of fibrinogen and plasminogen concentrations in rabbits during anaphylactic shock. J. lab. clin. Med., **58**, 259 (1961).
- GERHEIM, E., FERGUSON, J., TRAVIS, B., JOHNSTON, C. et BOYLES, P. : Staphylococcal fibrinolysis. Proc. Soc. exp. Biol. Med., **68**, 246 (1948).
- GITLIN, D. : Immunochemistry and its relationship to atherosclerosis. Connective Tissue, Thrombosis and Atherosclerosis, I.H. Page, éd., Academic Press, New York-London (1959) ; page 285.
- GRABAR, P. et WILLIAMS, C. : Méthode immunoélectrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques. Biochim. Biophys. Acta, **17**, 67 (1955).
- HARRINGTON, W. et ARIMURA, G. : Immune reactions of platelets. Blood Platelets, Little, Brown Co, éd., Boston, (1961).
- HJÖRT, P. et HASSELBACK, R. : A critical review of the evidence for a continuous hemostasis *in vivo*. Thromb. Diath. haemorrh., **6**, 580 (1961).

- HJÖRT, P., RAPAPORT, S. et OWREN, P. : Evidence that platelet accelerator (platelet factor 1) is adsorbed plasma proaccelerin. *Blood*, **10**, 1139 (1955).
- HUGUES, J. : Contribution à l'étude des facteurs vasculaires et sanguins dans l'hémostase spontanée. *Arch. int. Physiol.*, **66**, 565 (1953).
- ISRAEL, L., MATHE, G. et BERNARD, J. : Sur le syndrome de Schönlein-Henoch : 1. Reproduction expérimentale par un sérum humain. 2. Test décelant le pouvoir capillarotoxique. *Rev. franc. Et. clin. biol.*, **1**, 57 (1956).
- JAKES, L. : Multiple factors in hemorrhage. *Blood Platelets*, Little, Brown Co, Boston, (1961).
- JOHNSON, S. et SCHNEIDER, C. : The existence of anti-fibrinolysin activity in platelets. *Science*, **117**, 229 (1953).
- JÜRGENS, J. : In : II^e Symposium de la Fondation Valentino Baldacci, Omnia Medica, Pise, (1957) ; page 214.
- KABAT, E. et MAYER, M. : Experimental immunochemistry. 2d édition, C.C. Thomas, Springfield, Illinois, U.S.A., 1961.
- KJELDGAARD, N. et PLOUG, J. : Urokinase. An activator of plasminogen from human urine. II. — Mechanism of plasminogen activation. *Biochim. Biophys. Acta*, **24**, 283 (1957).
- KLINE, D. : The purification and crystallization of plasminogen (profibrinolysin). *J. biol. Chem.*, **204**, 949 (1953).
- KOLLER, F. : Fibrinolyse. *Schweiz. Med. Wschr.*, **90**, 1233 (1960).
- KOWALSKI, E., KOPEC, M. et NIEWIAROWSKI, S. : An evaluation of the euglobulin method for the determination of fibrinolysis. *J. clin. Path.*, **12**, 215 (1959).
- KRAMAR, J. : Capillary resistance and its relation to bleeding. *Blood Platelets*, Little, Brown Co, éd., Boston, (1961).
- KUNITZ, M. et NORTHROP, J. : Isolation from beef pancreas of crystalline, trypsinogen, trypsin inhibitor and an inhibitor trypsin compound. *J. gen. Physiol.*, **19**, 991 (1936).
- KWAAN, H. et MCFADZEAN, A. : On plasma fibrinolytic activity induced by ischemia. *Clin. Sci.*, **15**, 245 (1956).
- KWAAN, H., LO, R. et MCFADZEAN, A. : On the production of plasma fibrinolytic activity within veins. *Clin. Sci.*, **16**, 242 (1957).
- LAKI, K. et LORAND, L. : On the solubility of fibrin clots. *Science*, **108**, 280 (1948).
- LAKI, K., GLADNER, J., FOLK, J. et KOMINZ, D. : The mode of action of thrombin. *Thromb. Diath. haemorrh.*, **2**, 205 (1958).
- LAMBERT, P.H. et SALMON, J. : Complément et fibrinolyse. *C.R. Soc. Biol.*, **156**, 1948 (1962).
- LANDSTEINER, K. : The specificity of serological reactions. Harvard University Press, Cambridge, Mass., (1945).

- LAPRESLE, C. : Etude de la dégradation de la sérum-albumine humaine par un extrait de rate de lapin. II. — Mise en évidence de trois groupements spécifiques différents dans le motif antigénique de l'albumine humaine et de trois anticorps correspondants dans le sérum de lapin anti-albumine humaine. *Ann. Inst. Pasteur*, **89**, 654 (1955).
- LAPRESLE, C. et DURIEUX, J. : Etude de la dégradation de la sérum-albumine humaine par un extrait de rate de lapin. V. — Antigénicité de l'albumine dégradée. *Ann. Inst. Pasteur*, **94**, 38 (1958).
- LASCH, H. : Blutgerinnung im Shock. Actes du 7^e Congrès intern. de Médecine interne, Munich, 1962, G. Thieme, éd. Stuttgart, (1963).
- LASSEN, M. : Heat denaturation of plasminogen in the fibrin plate method. *Acta physiol. scand.*, **27**, 371 (1952).
- LECOMTE, J. et HUGUES, J. : Sur les réactions anaphylactiques des vaisseaux mésentériques du lapin. *Int. Arch. Allergy*, **8**, 72 (1956).
- LEFEBVRE, P., SALMON, J., LECOMTE, J. et VAN CAUWENBERGE, H. : Influence de l'acide ε -aminocaproïque sur l'augmentation de la perméabilité vasculaire provoquée chez le rat par l'histamine. Son action sur le purpura engendré, chez la souris, par l'huile de croton. *C.R. Soc. Biol.*, **156**, 183 (1962).
- LEVENE, C. : Electron-microscopy of atheroma. *Lancet*, **1**, 105 (1956).
- LEWIS, G.F. : Active polypeptides derived from plasma proteins. *Physiol. Rev.*, **40**, 647 (1960).
- LÜSCHER, E. Thrombozytenfaktoren. *Ergebnisse der Physiologie biologischen Chemie und experimentellen Pharmakologie*, Springer, éd., Berlin, (1959), **50**, 1.
- LÜSCHER, E. et KÄSER-GLANZMANN, R. : A new method for the quantitative determination of fibrinolytic activities based on the use of fluorescent fibrin as a substrate. *Vox Sang.*, **6**, 116 (1961).
- MACFARLANE, R. et BIGGS, R. : Observations on fibrinolysis spontaneous activity associated with surgical operations, trauma, etc. *Lancet*, **2**, 862 (1946).
- MARTIN DU GARD, R. : Les Thibault, Galimard, éd., Paris, (1946).
- MIESCHER, P. et COOPER, N. : The fixation of soluble antigen-antibody complexes upon thrombocytes. *Vox Sang.*, **5**, 138 (1960).
- MIESCHER, P. et VORLAENDER, K. : Immunopathologie in Klinik und Forschung. Thieme, éd., Stuttgart, (1957).
- MOVAT, H. et FERNANDO, N. : Allergic inflammation. The earliest fine structural changes at the blood-tissue barrier during antigen-antibody interaction. *Am. J. Path.*, **42**, 41 (1963).
- MÜLLERTZ, S. : Formation and properties of the activation of plasminogen and of human and bovin plasmin. *Biochem. J.*, **61**, 424 (1955).
- MULLERTZ, S. et LASSEN, M. : An activator system in blood indispensable for formation of plasmin by streptokinase. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **82**, 264 (1953).

- NIEWIAROWSKI, S. et KOWALSKI, E. : Un nouvel anticoagulant dérivé du fibrinogène. *Rev. Hémat.*, **13**, 320 (1958).
- NILSON, I., SJOERDSMA, A. et WALDENSTRÖM, J. : Antifibrinolytic activity and metabolism of ϵ -aminocaproic acid in man. *Lancet*, **1**, 1322 (1960).
- NOLF, P. : Contribution à l'étude de l'immunité propeptonique du chien. *Arch. int. Physiol.*, **2**, 1 (1905).
- NOLF, P. : Contribution à l'étude de la coagulation du sang (5^e mémoire) : La fibrinolyse. *Arch. int. Physiol.*, **6**, 306 (1908).
- NORMAN, P. : Studies of the plasmin system. II. — Inhibition of plasmin by serum or plasma. *J. exp. Med.*, **108**, 53 (1958).
- NORMAN, P. et HILL, B. : Studies of the plasmin system. III. — Physical properties of the two plasmin inhibitors in plasma. *J. exp. Med.*, **108**, 639 (1958).
- NUSSENZWEIG, V. et SELIGMANN, M. : Analyse par des méthodes immunochimiques de la dégradation par la plasmine du fibrinogène humain et de la fibrine, à différents stades. *Rev. Hémat.*, **15**, 451 (1960).
- NUSSENZWEIG, V., SELIGMANN, M. et GRABAR, P. : Les produits de dégradation du fibrinogène humain par la plasmine. *Ann. Inst. Pasteur*, **100**, 490 (1961).
- OLESEN, E. : Effect of acid polysaccharides on the fibrinolytic system in guinea pig serum. *Acta Pharmacol.*, **15**, 307 (1959).
- OSLER, A. : Functions of the complement system. *Advances in Immunology*, vol. 1., Academic Press, New York, (1961).
- OSLER, A., HAWRISIAK, M., OVARY, Z., SIQUEIRA, M. et BIER, O. : Studies on the mechanism of hypersensitivity phenomena. *J. exp. Med.*, **106**, 811 (1957).
- OTTO-SERVAIS, M. et LECOMTE, J. : Inhibition par l'acide ϵ -aminocaproïque des réactions anaphylactiques générales du lapin. *C.R. Soc. Biol.*, **155**, 2050 (1961).
- OUCHTERLONY, O. : Antigen-antibody reaction in gel. *Arki. Kemi. Miner. Geol. B.*, **26**, 14 (1948).
- PACHTER, M., JOHNSON, S., NEBLETT, T. et TRUANT, J. : Bleeding, platelets and macroglobulinemia. *Am. J. clin. Path.*, **31**, 467 (1959).
- PAPENHAGEN, A., KOPPEL, J. et OLWIN, J. : Use of fluorescein labeled fibrin for determination of fibrinolytic activity. *J. lab. clin. Med.*, **59**, 1039 (1962).
- PIOMELLI, S., STEFANINI, M. et MELE, R. : Attempts at experimental production of acute vascular (anaphylactoid) purpura. *Int. Arch. Allergy*, **21**, 65 (1962).
- PLoug, J. et KJELDGAARD, N. : Urokinase. An activator of plasminogen from human urine. I. — Isolation and properties. *Biochim. Biophys. Acta*, **24**, 278 (1957).
- REID, W., SOMLYO, A.V., SOMLYO, A.P. et CUSTER, R. : Role of the platelet in fibrinolysis. *Amer. J. clin. Path.*, **37**, 561 (1962).
- ROSKAM, J. : Contribution à l'étude de la physiologie normale et pathologique du globulin. *Arch. Int. Physiol.*, **20**, 241 (1923).

- ROSKAM, J. : Le purpura provoqué par hypertension veineuse. XX^e Congrès franç. Méd., Montpellier 1929, Masson, éd., Paris ; page 407.
- ROSKAM, J. : Purpuras hémorragiques et thrombopénie. Pathogénie du syndrome hémogénique engendré par l'administration de sérum anti-plaquettes. Sang, **8**, 129 (1934).
- ROSKAM, J. : L'hémostase spontanée. Masson et Cie, éd., Paris, (1951).
- ROSKAM, J. : Plaquettes et parois vasculaires dans la pathogénie du purpura thrombopénique chronique. Sang, **27**, 856 (1956).
- ROSKAM, J. : Le purpura provoqué par hypertension veineuse (épreuve du brassard). Thromb. Diath. haemorrh., **9**, 235 (1963).
- ROSS, J. : Blood coagulation as a continuous process. Thromb. Diath. haemorrh., **1**, 471 (1957).
- ROTHER, K. : Die Bedeutung des Komplement-Systems für allergische Reaktionen *in vivo*. Int. Arch. Allergy, **22**, 322 (1963).
- SALMON, J. : Réponse du coq à l'immunisation. C.R. Soc. Biol., **151**, 1047 (1957).
- SALMON, J. : Etude immuno-électrophorétique des antigènes plaquettaires humains. Schweiz. Med. Wschr., **88**, 1047 (1958).
- SALMON, J. : Recherches immunologiques sur l'existence d'une atmosphère plasmatique entourant les plaquettes humaines. Proc. 7th. Congr. internat. intern. Soc. Hémat., Rome 1958. Il Pensiero Scientifico, éd., Rome (1958).
- SALMON, J. : Etude immunochimique du fibrinogène et de ses dérivés. Clin. Chim. Acta, **4**, 767 (1959).
- SALMON, J. : Etude immunochimique de la fibrinolyse et de la fibrinogénolyse. Protides of the Biological Fluids, 1961. Elsevier éd., Amsterdam (1962), p. 308.
- SALMON, J. : La lésion vasculaire dans le purpura thrombopénique Bull. Acad. roy. Méd. Belg., VII^e série, **2**, 113 (1962).
- SALMON, J., VERSTRAETE, M. et BOUNAMEAUX, Y. : Fibrinogène plaquettaire et afibrinogénémie. Arch. int. Physiol. Biochim., **65**, 632 (1957).
- SALMON, J. et BOUNAMEAUX, Y. : Etude des antigènes plaquettaires et, en particulier, du fibrinogène. Thromb. Diath. haemorrh., **2**, 93 (1958).
- SALMON, J. et LECOMTE, J. : Rôle de la fibrinolyse dans le choc anaphylactique du lapin. Int. Arch. Allergy, **22**, 378 (1963).
- SALMON, J. et LECOMTE, J. : Kininogènes plasmatiques et fibrinolyse thérapeutique. Rev. Franç. Et. clin. biol., **8**, 473 (1963).
- SALMON, J., LAMBERT, P.H. et DELVIGNE, J. : Traitement fibrinolytique. Ses indications, sa surveillance, ses résultats. Acta Cardiol., **18**, 254 (1963).
- SANO, I., KAKIMOTO, Y., TANIGUCHI, K., et TAKESADA, M. : Active transport of epinephrine into-blood platelets. Am. J. Physiol., **197**, 81 (1959).

- SANYAL, R. et WEST, J. : Anaphylatic shock in the albino rat. *J. Physiol.*, **142**, 571 (1958).
- SAWYER, W., FLETCHER, A., ALKJAERSIG, N. et SHERRY, S. : Studies on the thrombolytic activity of human plasma. *J. clin. Invest.*, **39**, 426 (1960).
- SCHNEIDEGGER, J.J. : Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse. *Int. Arch. Allergy*, **7**, 103 (1955).
- SCHNEIDEGGER, J.J. et BUZZI, C. : Etude immuno-électrophorétique des γ -globulines. *Rev. Franç. Et. clin. biol.*, **2**, 895 (1957).
- SHERRY, S., FLETCHER, A.P. et ALKJAERSIG, N. : Fibrinolysis and fibrinolytic activity in man. *Physiol. Rev.*, **39**, 343 (1959).
- SHERRY, S., FLETCHER, A. et ALKJAERSIG, N. : Rationale and limitations of the use of thrombolytic (fibrinolytic) agents in the treatment of thromboembolic disease. *Progress in Hematology*, vol. 3, Grune et Stratton éd. New-York, (1962).
- SHULMAN, S., ALKJAERSIG, N. et SHERRY, S. : Physicochemical studies on human plasminogen (profibrinolysin) and plasmin (fibrinolysin). *J. biol. Chem.*, **233**, 91 (1958).
- SOBEL, G., MOHLER, S., JONES, N., DOWDY, A. et GUEST, N. : Urokinase : an activator of plasma profibrinolysin extracted from urine. *Am. J. Physiol.*, **171**, 768 (1952).
- SODOYER, J. et LECOMTE, J. : Inhibition à l'aide de l'acide ϵ -aminocaproïque, de la chute tensionnelle provoquée chez le rat par le dextran. *C.R. Soc. Biol.*, **155**, 2210 (1961).
- SOKAL, G. : Etude morphologique des plaquettes sanguines et de la métamorphose visqueuse au moyen d'antisérums fluorescents anti-fibrinogène et anti-plaquettes. *Acta haemat.*, **28**, 313 (1962).
- STAMM, H. : Einführung in die Klinik der Fibrinolyse, Karger, éd., Bâle (1962.)
- STEFANINI, M. et MURPHY, I. : Studies on platelets. XIV. Human platelets as source of antifibrinolysin. *J. clin. Invest.*, **35**, 355 (1956).
- TAGNON, H. et SOULIER, J. : Anticoagulant activity of the trypsin inhibitor from Soya bean flour. *Proc. Soc. exp. Med.*, **61**, 440 (1946).
- TAGNON, H., LEVENSON, S., DAVIDSON, C. et TALLYOR, F. : The occurrence of fibrinolysin in shock with observation on the prothrombin time and the plasma fibrinogen during hemorrhagic shock. *Am. J. Med. Sci.*, **211**, 88 (1946).
- TAGNON, H. et PALADE, G. : Activation of proplasmin by a factor from mammalian tissue. *J. clin. Invest.*, **29**, 317 (1950).
- TILLETT, W. et GARNER, R. : The fibrinolytic activity of hemolytic streptococci. *J. exp. Med.*, **58** : 485 (1933).
- TOCANTINS, L. et STEWART, H. : Pathological anatomy of experimental thrombopenic purpura in the dog. *Am. J. Path.*, **15**, 1 (1939).
- TROLL, W., SHERRY, S. et WACHMAN, J. : The action of plasmin on synthetic substrates. *J. biol. Chem.*, **208**, 85 (1954).

- TROLL, W., et SHERRY, S. : The activation of human plasminogen by streptokinase. *J. biol. Chem.*, **213**, 881 (1955).
- TURKSOY, R., PHILIPS, L. et SOUTHAM, A. : Influence of ovarian function on the fibrinolytic enzyme system. *Am. J. Obst. Gynec.*, **82**, 1241 et 1216 (1961).
- UNGAR, G. et MIST, S. : Observations on the release of serum fibrinolysin by specific antigen, pepton and certain polysaccharides. *J. exp. Méd.*, **90**, 39 (1949).
- UNGAR, G., DAMGAARD, E. et HUMMEL, F. : Activation for profibrinolysin by antigen-antibody réaction and by anaphylactoid agents : its relation to complement. *J. exp. Med.*, **98**, 201 (1953).
- UNGAR, G. et DAMGAARD, E. : Tissue reactions to anaphylactic and anaphylactoid stimuli : proteolysis and release of histamin and heparin. *J. exp. Med.*, **101**, 1 (1955).
- UNGAR, G., YAMURA, T., ISOLA, J. et KOBRIN, S. : Further studies on the role of protease in the allergic reaction. *J. exp. Med.*, **113**, 354 (1961).
- VERMYLEN, C., DE VREEKER, R. et VERSTRAETE, M. : A quick quantitative enzymatic fibrinogen assay method. *Protides of the Biological Fluids*, Elsevier, éd., Amsterdam (1962).
- VERSTRAETE, M. et AMERY, A. : Experiences cliniques avec la streptokinase comme agent thrombolytique. *Acta Cardiol.*, **18**, 235 (1963).
- VON KAULLA, K. : Intravenous protein-free pyrogen : a powerful fibrinolytic agent in man. *Circulation*, **17**, 187 (1958).
- VON KAULLA, K. et SCHULTZ, R. : Methodes for the evaluation of human fibrinolysis. *Ap. J. clin. Path.*, **29**, 104 (1958).
- VON KAULLA, K. et WEINER, M. : Studies on coagulation and fibrinolysis by a new technic of continuous recording. *Blood*, **10**, 362 (1955).
- VON KAULLA, K., SWAN, H. et PATON, B. : Variations in thrombin time in certain patients undergoing open-heart surgery. Discussion of its prognostic significance. *J. Thorac. Cardio. Surg.*, **40**, 260 (1960).
- WARE, A., FAHEY, J. et SEEGER, W. : Platelets extracts, fibrin formation and interaction of purified prothrombin et thromboplastin. *Am. J. Physiol.* : **154**, 140 (1948).
- WEINER, M., REDISCH W., et STELLE, J.M. : Occurence of fibrinolytico activity following administration of nicotinic acid. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **98**, 755 (1958).
- WILLIAMS, J. : The fibrinolytic activity of urine. *Brit. J. exp. Path.*, **32**, 530 (1951).
- WRIGHT, I., KOLLER, F. et STREULI, F. : Thrombolytic activity and related phenomena, F.K. Schattauer, éd., Stuttgart (1961).
- ZWEIFACH, B., NAGLER, A. et TROLL, W. : Sone effects of proteolytic inhibitors on tissue injury and systemic anaphylaxis. *J. exp. Med.*, **113**, 437 (1961).

